

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

**Respuesta hepática durante la isquemia-reperfusión
pulmonar modulada con preconditionamiento isquémico en
un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Javier Huerta Martínez

DIRECTORES

**Carlos Simón Adiego
Federico González Aragonese
Elena Vara Amegeiras**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



***RESPUESTA HEPÁTICA DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN
PULMONAR MODULADA CON PRECONDICIONAMIENTO
ISQUÉMICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
AUTOTRASPLANTE PULMONAR EN CERDO***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

LUIS JAVIER HUERTA MARTÍNEZ

Bajo la dirección de los doctores

DR. CARLOS SIMÓN ADIEGO

DR. FEDÉRICO GONZÁLEZ ARAGONESES

DRA. ELENA VARA AMEIGEIRAS

MADRID, 2015



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	LUIS JAVIER HUERTA MARTÍNEZ
Título de la Tesis	RESPUESTA HEPÁTICA DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR MODULADA CON PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOTRASPLANTE PULMONAR EN CERDO
Facultad o Centro	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	CARLOS SIMÓN ADIEGO
Centro al que pertenece y dirección	FEA CIRUGÍA TORÁCICA DEL HGU GREGORIO MARAÑÓN PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA UCM
D.N.I./Pasaporte	513742328X
e-mail	carlosmsa@telefonica.net

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	<i>Muy Buena</i>	<i>Buena</i>	<i>Suficiente</i>	<i>Deficiente</i>
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El doctorando D. Luis Huerta Martínez ha participado activamente como investigador en el proyecto de investigación del que es fruto esta tesis doctoral, cuyos principales resultados han sido publicados en la revista European Journal of Cardithoracic Surgery, indexada en el Journal of Citation Repots, y en diferentes congresos de ámbito nacional e internacional.

Durante más de cinco años ha colaborado en los proyectos de investigación de nuestro equipo, desarrollando actividades experimentales, estudio y documentación, análisis de resultados y redacción de comunicaciones y publicaciones que le capacitan para optar al Grado Académico de Doctor.

Durante más de tres años ha enfocado su actividad investigadora al proyecto específico que presenta en esta tesis, “Respuesta hepática durante la isquemia-reperfusión pulmonar modulada con preconditionamiento isquémico en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo”, que reúne todas las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor y ser expuesto y discutido ante el tribunal correspondiente.

Madrid, a 17 de septiembre de 2015

Fdo.: Carlos María Simón Adiego

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	LUIS JAVIER HUERTA MARTÍNEZ
Título de la Tesis	RESPUESTA HEPÁTICA DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR MODULADA CON PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOTRASPLANTE PULMONAR EN CERDO
Facultad o Centro	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	FEDERICO GONZÁLEZ ARAGONESES
Centro al que pertenece y dirección	JEFE DE SERVICIO CIRUGÍA TORÁCICA HGU GREGORIO MARAÑÓN PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UCM
D.N.I./Pasaporte	01379244A
e-mail	fgaragoneses@hotmail.com

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	<i>Muy Buena</i>	<i>Buena</i>	<i>Suficiente</i>	<i>Deficiente</i>
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo realizado por D. Luis Huerta Martínez, con el título “Respuesta hepática durante la isquemia-reperfusión pulmonar modulada con preconditionamiento isquémico en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo”, reúne satisfactoriamente las características necesarias de originalidad, planteamiento de la hipótesis de trabajo, desarrollo metodológico y discusión crítica de los resultados para optar al Grado Académico de Doctor, y considero que dicho trabajo puede ser expuesto y discutido por el doctorando ante el tribunal correspondiente.

Madrid, a 17 de septiembre de 2015

Fdo.: Federico González Aragonese

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	LUIS JAVIER HUERTA MARTÍNEZ
Título de la Tesis	RESPUESTA HEPÁTICA DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR MODULADA CON PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOTRASPLANTE PULMONAR EN CERDO
Facultad o Centro	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	ELENA VARA AMEIGEIRAS
Centro al que pertenece y dirección	CATEDRÁTICA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UCM
D.N.I./Pasaporte	33202901D
e-mail	evaraami@ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	<i>Muy Buena</i>	<i>Buena</i>	<i>Suficiente</i>	<i>Deficiente</i>
Originalidad	x			
Definición Objetivos	x			
Metodología	x			
Relevancia Resultados	x			
Discusión / Conclusiones	x			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Luis Huerta Martínez ha participado activamente con nosotros como investigador en diferentes proyectos de investigación subvencionados enfocados en la posible modulación de la respuesta inflamatoria hepática secundaria a la I/R del pulmón, mediante preconditionamiento isquémico. Ha participado en todos los procedimientos quirúrgicos, y ha colaborado en la realización de las determinaciones bioquímicas.

Su participación en estos proyectos le ha permitido realizar una serie de actividades experimentales, conducentes a la obtención del Grado Académico de Doctor. En este período ha obtenido una serie de logros y resultados que se han materializado hasta la fecha en publicaciones en revistas indexadas en el Journal of Citation Reports. También ha participado en diversos congresos científicos, tanto nacionales como internacionales, donde se han presentado los resultados de su trabajo. Por todo ello, considero que el trabajo realizado reúne las características necesarias de originalidad, planteamiento adecuado de la hipótesis de trabajo, desarrollo metodológico adecuado y discusión crítica de los resultados para ser defendida como tesis doctoral.

Madrid, a 17 de septiembre de 2015

Fdo.: Elena Vara Ameigeiras

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento,

Al Dr. Carlos Simón Adiego, Médico Adjunto de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por iniciarme y guiarme en el mundo de la investigación científica. Es de admirar su capacidad de trabajo y su espíritu docente e investigador.

Al Dr. Federico González Aragonese, Jefe de Servicio de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, porque además de ser una referencia en el campo de la cirugía torácica, siempre me ha apoyado tanto en el trabajo clínico como de investigación.

A la Dra. Elena Vara Ameigeiras, Catedrática del Departamento de Bioquímica y de Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme mostrado el camino de la Investigación Bioquímica, un mundo complejo y hasta ahora desconocido para mí.

A todos los Residentes de Cirugía Torácica y Anestesiología, a los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y a los estudiantes que han participado en el proyecto y han trabajado en él de forma constante y desinteresada.

A mis padres y hermanos por ser el pilar clave en mi formación, tanto académica, como de la vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALT: alanina aminotransferasa

AP 1: Proteína activadora 1

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: trifosfato de adenosina

BUN: nitrógeno ureico en sangre

B: Basal

cADN: ADN complementario

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

Canales K_{ATP} : canales de potasio sensibles a ATP

CD73: Clúster de diferenciación 73

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico

COX-2: Ciclooxygenasa 2

DE: desviación estándar

DIR: daño por isquemia-reperfusión

DPA: daño pulmonar agudo

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligada a Enzimas

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ERO: especies reactivas de oxígeno

FC: Frecuencia cardiaca

Fig: Figura

Grupo CON: Grupo control

Grupo PI: Grupo preconditionamiento isquémico

Grupo SHAM: grupo simulado

HO-1: Hemo-oxigenasa 1 (Isoforma inducible)

HO-2: Hemo-oxigenasa 2 (Isoforma constitutiva)

HPS: Proteínas de choque térmico

IC: Índice cardíaco

IgG: Inmunoglobulina G

ikB: inhibidor fracción B

IL-1: Interleuquina 1

IL-1 β : Interleuquina 1 beta

IL-4: Interleuquina 4

IL-6: Interleuquina 6

IL-8: Interleuquina 8

IL-9: Interleuquina 9

IL-10: Interleuquina 10

IL-11: Interleuquina 11

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IR: isquemia-reperfusión

LDH: Lactato deshidrogenasa

mARN: ARN mensajero

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1

MFG-E8: Grasa de la leche glóbulo-EGF factor de 8 proteínas

mM: minimolar

mmHg: milímetros de mercurio

NADP: forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

nm: nanómetro

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

PAF: Factor activador de plaquetas

PAM: Presión arterial media

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PECAM-1: molécula de adhesión celular plaqueto-endotelial 1

PCO₂: Presión arterial de dióxido de carbono

PGE₂: Prostaglandina E₂

PI: Precondicionamiento isquémico

PIR: preconditionamiento remoto

PKC: Proteína quinasa C

PMN: polimorfonucleares

Pn: Pre-neumonectomía

PO₂: Presión arterial de oxígeno

PRp: Pre-reperusión

rARN: ARN ribosomal

Rp-10': 10 minutos post-reperusión

Rp-30': 30 minutos post-reperusión

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SDOM: síndrome de disfunción orgánica múltiple

SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo

SDS: Dodecilsulfato sódico

SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

TNF α : Factor de necrosis tumoral alpha

T-TBS: amortiguador salino de tris + Tween 20

VUP: Ventilación unipulmonar

XIAP: Factor inhibidor de la apoptosis X

2- $\Delta\Delta$ CT: método 2 delta delta umbral de ciclo

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	27
1.1 Daño por isquemia-reperfusión (DIR)	29
1.1.1 <i>Fisiopatología del DIR</i>	30
1.1.1.1 Respuesta microvascular local	30
1.1.1.2 Estrés oxidativo	31
1.1.1.3 Papel de las especies reactivas de oxígeno (ERO)	32
1.1.1.4 Mediadores de la inflamación	32
1.1.1.5 Metabolismo del Óxido Nítrico (NO)	36
1.1.2 <i>Manifestaciones clínicas</i>	37
1.1.3 <i>Modelos experimentales y clínicos de DIR</i>	39
1.2 Isquemia-reperfusión pulmonar	41
1.2.1 <i>Fisiopatogenia del daño por IR pulmonar</i>	43
1.2.1.1 Efectos microvasculares de la IR pulmonar	43
1.2.1.2 Estrés oxidativo en el daño por IR pulmonar. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	43
1.2.1.3 Papel de los leucocitos y las plaquetas en la IR pulmonar	44
1.2.1.4 Papel de las moléculas de adhesión en la IR pulmonar	44
1.2.1.5 Papel del NO en la IR pulmonar	45
1.2.1.6 Sistema Hemo-oxigenasa	46
1.2.2 <i>Modelos experimentales de daño por IR pulmonar</i>	46
1.3 Precondicionamiento isquémico	48
1.3.1 <i>Precondicionamiento isquémico clásico o directo</i>	49
1.3.1.1 Moléculas implicadas en el preconditionamiento isquémico	51
1.3.2 <i>Precondicionamiento isquémico remoto o indirecto</i>	54

1.3.3	<i>Modelos experimentales y clínicos de preconditionamiento isquémico</i>	55
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
2.1	Hipótesis principal	59
2.2	Hipótesis secundarias	59
2.3	Objetivo principal	60
2.4	Objetivos secundarios	60
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1	Resumen	63
3.2	Material	63
3.2.1	<i>Material biológico: animales</i>	63
3.2.2	<i>Aparataje y material fungible</i>	64
3.2.3	<i>Quirófano e instalaciones</i>	66
3.3	Métodos	68
3.3.1	<i>Descripción del experimento</i>	68
3.3.2	<i>Protocolo anestésico</i>	69
3.3.3	<i>Protocolo quirúrgico</i>	70
3.3.4	<i>Diseño experimental</i>	74
3.3.5	<i>Momentos de medición y toma de muestras</i>	75
3.3.6	<i>Variables hemodinámicas</i>	76
3.3.7	<i>Variables gasométricas</i>	77
3.3.8	<i>Variables bioquímicas en el tejido hepático</i>	77
3.4	Análisis estadístico	81
4.	RESULTADOS	83
4.1	Variables generales	85
4.2	Variables hemodinámicas	86

4.3 Variables gasométricas	90
4.4 Variables bioquímicas	94
4.4.1 <i>Citoquinas proinflamatorias</i>	94
4.4.2 <i>Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)</i>	102
4.4.3 <i>Citoquina antiinflamatoria Interleuquina 10 (IL-10)</i>	105
4.4.4 <i>Factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB)</i>	108
4.4.5 <i>Metabolismo del Óxido Nítrico</i>	110
4.4.6 <i>Apoptosis</i>	113
5. DISCUSIÓN	115
5.1 Efectos del síndrome de isquemia-reperfusión pulmonar	117
5.2 Precondicionamiento isquémico pulmonar	129
6. CONCLUSIONES	141
7. BIBLIOGRAFÍA	145
8. ANEXO	169

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

El daño por isquemia-reperfusión es reconocido como un serio problema que acompaña a diversos procedimientos médicos y quirúrgicos habituales tales como la terapia trombolítica, el trasplante de órganos, la angioplastia coronaria y el *by-pass* cardiopulmonar.

La isquemia-reperfusión pulmonar induce una respuesta inflamatoria local en el propio parénquima pulmonar caracterizada por daño alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia.

La isquemia-reperfusión pulmonar también induce una respuesta inflamatoria sistémica con afectación de órganos remotos, la cual es incluso más dañina que sus efectos locales.

Estudios previos han demostrado en modelos clínicos y experimentales que el hígado es particularmente sensible a la liberación de mediadores inflamatorios, hecho que ocurre tras la isquemia-reperfusión de órganos remotos tales como: riñón, intestino y músculo esquelético.

Se ha comprobado que el preconditionamiento isquémico directo es capaz de proteger a diversos órganos frente al daño por isquemia-reperfusión. Nuestro grupo ha demostrado previamente en un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdo, que el preconditionamiento isquémico atenúa el daño por isquemia-reperfusión pulmonar mediante la prevención del aumento de los metabolitos de peroxidación lipídica, la activación leucocitaria y las citoquinas proinflamatorias en el parénquima pulmonar.

Recientemente, el preconditionamiento isquémico remoto, definido como la aplicación de episodios repetitivos de isquemia en un órgano remoto del órgano a proteger, ha sido

propuesto como herramienta quirúrgica para prevenir el daño por isquemia-reperfusión cardiaca, hepática o cerebral.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es investigar un posible efecto protector del preconditionamiento isquémico frente a la respuesta inflamatoria hepática secundaria a la isquemia-reperfusión pulmonar. Para ello se usó un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Dos grupos de diez cerdos de la raza *Large-White* fueron sometidos a un autotrasplante pulmonar izquierdo ortotópico que incluye una neumonectomía izquierda, una lobectomía craneal *ex situ*, y la reimplantación del lóbulo caudal.

Previo a la realización de la neumonectomía, en el grupo experimental se llevaron a cabo las maniobras de preconditionamiento isquémico mediante la aplicación de dos ciclos de cinco minutos de oclusión de la arteria pulmonar izquierda con un intervalo de perfusión de cinco minutos entre las dos oclusiones.

Además, cinco animales fueron sometidos a cirugía simulada. En este grupo, no se realizó resección pulmonar ni se aplicaron las maniobras de preconditionamiento isquémico.

Las mediciones hemodinámicas y de los gases arteriales, así como la toma de biopsias hepáticas se realizaron en los siguientes momentos del experimento: basal, pre-neumonectomía, pre-reperfusión, 10 minutos después de la perfusión del lóbulo y 30 minutos post-reperfusión.

Los diferentes parámetros estudiados en el parénquima hepático fueron:

- Los valores de TNF α , IL-1, IL-10 e iNOS fueron obtenidos mediante análisis Western Blot.

- La expresión hepática del mRNA de la MCP-1, TNF α , IL-1, IL-10, NF κ B, e iNOS fue analizada mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.
- El valor de la Caspasa 3, la cual juega un papel importante en el fenómeno de la apoptosis, fue medido mediante el kit ELISA.

En el análisis estadístico se usaron test no paramétricos para comparar las diferencias entre los valores intragrupo e intergrupos.

4. RESULTADOS

Los resultados de nuestro estudio demuestran que:

- Los valores hemodinámicos y gasométricos mostraron una gran estabilidad durante el experimento en los tres grupos.
- La isquemia-reperfusión pulmonar indujo un aumento de la expresión proteica y del mRNA del TNF α y de la IL-1 en el hígado. Las maniobras de preconditionamiento isquémico bloquearon dicho aumento.
- La isquemia-reperfusión pulmonar incrementó la expresión hepática del mRNA de la MCP-1. El preconditionamiento isquémico previno dicho incremento.
- Respecto a la IL-10, se observó una disminución de la expresión del mRNA de la IL-10 tras la perfusión pulmonar en el grupo control. En los grupos preconditionamiento y cirugía simulada no se dio este hecho.
- La isquemia-reperfusión pulmonar indujo un aumento en la expresión del mRNA del NF κ B en el grupo control durante la perfusión. Por el contrario, su expresión en los grupos preconditionamiento y cirugía simulada presentó gran estabilidad durante el procedimiento.
- En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas respecto a la expresión del iNOS.

- Finalmente, la expresión de Caspasa 3 aumentó durante el procedimiento en los tres grupos. No obstante, este aumento fue significativamente mayor en el grupo control en comparación con el grupo preconditionamiento.

5. CONCLUSIONES

En nuestro modelo experimental la isquemia-reperfusión pulmonar indujo una respuesta inflamatoria hepática caracterizada por un desequilibrio entre la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias. También se observó una respuesta apoptótica en el hígado tras la isquemia-reperfusión pulmonar.

Nuestro estudio sugiere que el preconditionamiento isquémico reduce la respuesta inflamatoria y apoptótica hepática inducida por la isquemia-reperfusión pulmonar.

ABSTRACT

1. INTRODUCTION

Ischaemia-reperfusion injury is recognized as a potentially serious problem that is found during a variety of standard medical and surgical procedures, such as thrombolytic therapy, organ transplantation, coronary angioplasty, and cardiopulmonary by-pass.

Lung ischaemia-reperfusion induces a local inflammatory response in the pulmonary tissue characterized by nonspecific alveolar damage, lung oedema, and hypoxemia.

Lung ischaemia-reperfusion also induces a systemic inflammatory response with damage to remote organs.

Previous studies have shown in clinical and experimental models that the liver is particularly sensitive to circulating inflammatory mediators that occur after ischaemia-reperfusion of remote organs such as: kidney, gut and skeletal muscle.

Direct ischemic preconditioning has been proved to protect several organs from ischaemia-reperfusion injury. Our team has previously shown that, in a swine model of lung autotransplant, ischemic preconditioning attenuates lung ischaemia-reperfusion injury by preventing the increase in lipid peroxidation metabolites, leukocyte activation and the proinflammatory cytokines in lung tissue.

Recently, remote ischemic preconditioning, defined as ischemic preconditioning by repetitive ischemic episodes of an organ remote from the organ to be protected, has been proposed as a surgical tool to prevent cardiac, hepatic or brain ischaemia-reperfusion injury.

2. OBJECTIVE

The objective of the present study was to investigate a possible protective effect of ischemic preconditioning against liver inflammatory response to lung ischaemia-reperfusion, using an experimental swine lung autotransplant model.

3. MATERIALS AND METHODS

Two groups of ten Large-White pigs underwent an orthotopic left lung autotransplant which entails left pneumonectomy, ex situ cranial lobectomy and left caudal reimplantation.

Before pneumonectomy was performed in the study group, ischemic preconditioning was obtained through two-separate five-minute pulmonary artery clamping attempts with a five-minute interval reperfusion between the two occlusions.

In addition, five animals were submitted to sham surgery. In this group, no lung resection and no ischemic preconditioning were carried out.

Haemodynamic and arterial blood gas measurements, as well as liver biopsies were performed at the following time points: baseline; prepneumonectomy; prereperfusion; 10 minutes after the reperfusion of the reimplanted lobe and 30 minutes after the reperfusion.

The different liver tissue parameters to be studied were:

- TNF α , IL-1, IL-10 and iNOS protein expressions were gathered through Western blot analysis.
- MCP-1, TNF α , IL-1, IL-10, NF κ B and iNOS mRNA expressions, were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction.
- Caspase 3 protein expression that plays a relevant role in apoptosis was measured with ELISA kits.

Non-parametric statistical analyses were used to compare differences between groups and intragroup values.

4. RESULTS

As to our results

- Haemodynamic and arterial gasometric values showed great stability throughout the experiment in all groups.
- Lung ischaemia-reperfusion increased TNF α and IL-1 protein and mRNA expression in control group livers. Ischemic preconditioning blocked these effects.
- Lung ischaemia-reperfusion increased MCP-1 mRNA expression in liver tissue. This increase was prevented by ischemic preconditioning.
- Regarding IL-10, a decrease of IL-10 mRNA expression was observed after lung reperfusion in the liver of the CON group, but not in the IP or SHAM groups.
- Lung ischaemia-reperfusion increased NF κ B mRNA expression in control group livers at reperfusion.
- Finally, caspase 3 protein levels continuously increased throughout the procedure in all three groups. However, this increase was higher in CON group compared with IP group.

5. CONCLUSIONS

In this model, lung ischaemia-reperfusion induced a remote hepatic inflammatory response, reflected by increasing imbalance between pro and anti-inflammatory cytokine production. We have also shown an apoptotic response in the liver after lung ischaemia-reperfusion.

This study suggests that, lung ischaemic preconditioning reduces the inflammatory and apoptotic responses induced in liver by lung ischaemia-reperfusion injury.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (DIR)

La isquemia tisular causada por un indebido o nulo aporte de sangre a los tejidos ha sido estudiada en profundidad por múltiples investigadores durante años. Bien conocidas son sus consecuencias a nivel del tejido afecto y su repercusión en el organismo como sistema, de ahí la insistencia en la búsqueda de métodos que permitan restablecer el flujo sanguíneo en los tejidos isquémicos con el fin de evitar los procesos de necrosis y conservar su funcionalidad.

No obstante, se ha comprobado que la reperfusión de los tejidos isquémicos, esto es el restablecimiento del flujo sanguíneo tras un período determinado de isquemia, no está exenta de alteraciones funcionales. Sabemos que las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos del sistema microvascular son especialmente vulnerables a las consecuencias de la isquemia y posterior reperfusión. De hecho la disfunción microvascular inducida por el proceso de isquemia-reperfusión (IR) orgánico, ha sido reconocida como un problema de alta magnitud que acompaña a gran cantidad de procedimientos médicos y quirúrgicos habituales, tales como la terapia trombolítica, el trasplante de órganos, la angioplastia coronaria y el *by-pass* cardiopulmonar (1).

La identificación de la disfunción microvascular como factor determinante en la patogenia del daño por IR ha dado pie a numerosas investigaciones orientadas a la caracterización de los mecanismos que subyacen bajo dicho proceso patológico. Estas investigaciones han revelado la presencia de cambios moleculares y bioquímicos en la pared de los vasos propios de un proceso de inflamación aguda (2-4). La intensidad de dicho proceso inflamatorio en tejidos postisquémicos puede ser de tal magnitud que se manifieste en órganos remotos (5), siendo frecuentemente observados en el sistema pulmonar y cardiovascular, pudiendo incluso desencadenar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y un síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM) (5).

1.1.1 FISIOPATOLOGÍA DEL DIR

1.1.1.1 RESPUESTA MICROVASCULAR LOCAL

Las células endoteliales son particularmente vulnerables a los efectos deletéreos de la isquemia y de la reperfusión. La hipoxia mantenida induce una alteración del potencial de membrana, interfiere en la distribución de los iones, produce un aumento del volumen intracelular y una alteración de la permeabilidad membranosa y altera la organización citoesquelética de las células endoteliales. Estos cambios se acompañan de un detrimento de las reservas energéticas, de una disminución de ciertos agentes bioactivos (prostaciclina, NO), así como un incremento en la síntesis de otros (endotelina, tromboxano A₂). Paralelamente, algunos genes son inducidos (citoquinas, moléculas de adhesión leucocitaria) mientras que otros son suprimidos (6).

La mayoría de estos hallazgos se exacerban tras el restablecimiento del flujo sanguíneo (7). El período inicial de la reperfusión viene marcado por una severa disfunción endotelial que puede tener lugar incluso en ausencia de cambios morfológicos obvios. Algunas de las alteraciones morfológicas que caracterizan dicho período son el edema celular, la pérdida de las vesículas pinocíticas, la separación de las células endoteliales de su membrana basal, y la adhesión de leucocitos activados a la superficie endotelial (8).

La disfunción endotelial inducida por el proceso de IR se manifiesta de manera diferente en los distintos tramos de la microcirculación (3):

- La disfunción endotelial de las *vénulas postcapilares* constituye la respuesta inflamatoria principal asociada al proceso de IR. Algunas de sus características son la adhesión leucocito-endotelial, la migración leucocitaria transendotelial, la agregación leucocitaria, la extravasación de albúmina y el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) (3).

- La disfunción endotelial en las *arteriolas* es endotelio-dependiente, jugando un importante papel los leucocitos activados y las moléculas de adhesión leucocito-endotelial (9).

- Las alteraciones halladas en los *capilares* se relacionan principalmente con la reducción de la biodisponibilidad del NO (10).

1.1.1.2 ESTRÉS OXIDATIVO

Las células endoteliales experimentan un estrés oxidativo tras el proceso de IR en todos los tramos de la microcirculación. La actividad de la enzima xantina oxidasa es uno de los principales mecanismos implicados al favorecer la síntesis de especies reactivas de oxígeno.

La isquemia celular induce una degradación del ATP dando lugar a una producción y acumulación de hipoxantina. En condiciones normales, la enzima xantina deshidrogenasa es la responsable de la oxidación de la hipoxantina a xantina y del posterior paso a ácido úrico al mismo tiempo que induce la reducción del NADP a NADPH. Durante el tiempo de isquemia la xantina deshidrogenasa se convierte en xantina oxidasa, la cual es dependiente de O₂ para catabolizar la hipoxantina (Fig. 1). La consecuencia es un acúmulo de hipoxantina durante el período de isquemia, de modo que cuando el oxígeno es reintroducido al torrente sanguíneo durante la reperfusión dicho exceso de hipoxantina es metabolizado produciendo elevadas concentraciones de ERO, tales como anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Fig. 1) (2).

Este mecanismo se sustenta en estudios en los que las vénulas postisquémicas fueron tratadas con inhibidores de la xantina oxidasa (alopuridol) resultando en una atenuación del estrés oxidativo (11).

La actividad plasmática de la enzima xantina oxidasa aumenta de forma considerable tras los procesos de oclusión y reperfusión aórtica (12) y los de isquemia y reperfusión hepática (13) y gastrointestinal (14). Dicho incremento está íntimamente relacionado con el daño remoto pulmonar, hepático y miocárdico (12-15).

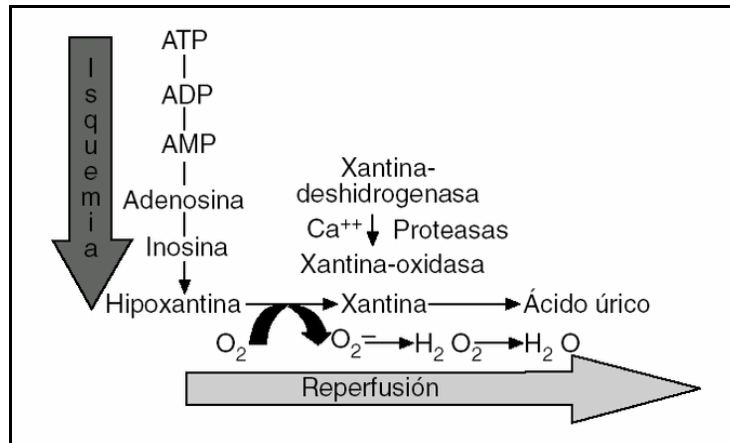


Fig. 1: Formación de radicales libres en el síndrome IR. Sistema Xantina Oxidasa

1.1.1.3 PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

La reperfusión de un tejido isquémico estimula la formación de ERO tales como el anión superóxido (O_2^-), los radicales hidroxilo (OH^\cdot), el ácido hipocloroso ($HOCl$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$).

Las ERO inducen daño tisular mediante diferentes mecanismos: peroxidación de los lípidos de la membrana celular, activación de la enzima fosfolipasa A_2 y formación de araquinodato (precursor de eicosanoides como el tromboxano A_2 y leucotrieno B_4), y activación de factores de transcripción ($NF\kappa B$ y AP-1) que incrementan la expresión génica de citoquinas y moléculas de adhesión leucocitaria (16).

1.1.1.4 MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN

Los tejidos postisquémicos generan mediadores inflamatorios induciendo la atracción y activación de los neutrófilos circulantes (17, 18). Por ejemplo, se ha comprobado un aumento en la expresión de moléculas de adhesión endotelial y de neutrófilos tras la oclusión aórtica (18), así como la liberación tanto de $TNF\alpha$ como de Tromboxano B_2 en la circulación (17).

- **Papel de los leucocitos y de las moléculas de adhesión**

La activación leucocitaria, la adhesión celular leucocito-endotelial y la trans migración leucocitaria participan activamente en el DIR (19).

La adhesión leucocito-endotelial está mediada por la P-selectina y las integrinas β_2 leucocitarias, mientras que la trans migración leucocitaria al espacio intersticial viene facilitada por la molécula de adhesión plaqueto-endotelial (PECAM-1). Paralelamente, los leucocitos activados liberan ERO, proteasas y elastasas que inducen un incremento de la permeabilidad microvascular, edema, trombosis y muerte celular (1).

- **Citoquinas**

Las citoquinas son moléculas de naturaleza proteica (glicoproteínas) de bajo peso molecular. Pueden ser liberadas tanto por células del sistema inmune (macrófagos y linfocitos T) como por células no inmunes (fibroblastos, células endoteliales).

Ejercen sus efectos mediante la unión a receptores específicos de membrana activando a su vez las cascadas de transducción intracelular. Existe sinergia entre las distintas citoquinas, permitiendo retroregulaciones negativas y positivas entre ellas. Su producción es breve y limitada en el tiempo, esto es, mientras dure el estímulo.

Algunas de las acciones propias de las citoquinas son la modulación de la respuesta inmune, el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas y la regeneración tisular y angiogénesis (20).

- Interleuquinas

Las interleuquinas son sintetizadas principalmente por los leucocitos, conociéndose diversos subtipos con características bioquímicas y funcionales diferentes. De hecho, algunas de ellas (IL-4, IL-10, IL-11) se relacionan con efectos beneficiosos, mientras que otras (IL-1, IL-6, IL-8) inducen efectos delétereos. La IL-1, específicamente la forma IL-1 β , es una de las principales moléculas implicadas en la etiopatogenia del IR. La IL-1 β participa activamente en la liberación de otros mediadores (prostaglandinas, leucotrienos e IL-8), así como en el aumento de la permeabilidad vascular y en la síntesis de ERO (21).

- TNF α

El TNF α es una glicoproteína de 185 aminoácidos que está íntimamente relacionada con la respuesta inflamatoria sistémica que acontece en el seno de la IR. Se ha comprobado experimentalmente que la administración de TNF α reproduce clínicamente los signos del SDOM en animales (22). Además, el TNF α participa en el reclutamiento de mediadores inflamatorios tales como las inmunoglobulinas, las células inflamatorias y el sistema del complemento e induce la activación de los linfocitos T y B. Es un importante mediador en la inflamación local a través de sus acciones sobre el endotelio: aumenta la activación y adhesión plaquetaria y la permeabilidad vascular.

- MCP-1

La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) es una quimioquina que regula la migración y activación de los monocitos y macrófagos, jugando un papel crucial en el reclutamiento de macrófagos en la inflamación tisular (23). La síntesis de la MCP-1 se ha relacionado con la acción de otras citoquinas como la IL-1 y el TNF α (Fig. 2) (24).

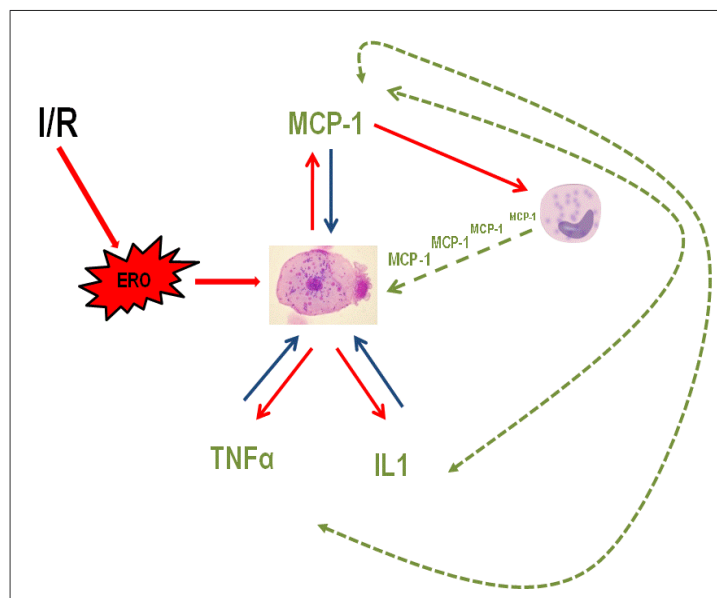


Fig. 2: Síntesis de MCP-1 y su relación con TNF α e IL-1

- **Factor de transcripción nuclear NFκB**

Es un factor de transcripción pleiotrópico implicado en los procesos de diferenciación y apoptosis (25). La forma inactiva del NFκB se encuentra en el citoplasma celular unido a proteínas inhibitorias (IκBs). Su activación conlleva a su translocación al núcleo celular donde induce la transcripción de diversos genes de estirpe inflamatoria, iniciando por tanto la síntesis de citoquinas proinflamatorias [IL-1β (26), IL-6, TNFα], enzimas proinflamatorias (COX-2 e iNOS) y de moléculas de adhesión (Fig. 3).

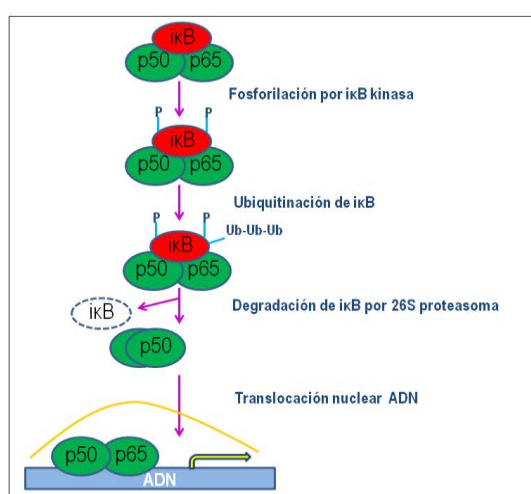


Fig. 3: Síntesis y activación del NFκB

- **Apoptosis**

La apoptosis constituye un mecanismo esencial en el mantenimiento de la homeostasis, interviniendo en diversos procesos orgánicos fisiológicos. No obstante se ha comprobado que participa en situaciones patológicas, siendo uno de los mecanismos implicados en la muerte celular debida al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (27).

Las caspasas son una familia de proteasas sintetizadas como zimógenos, esto es, precursores enzimáticos inactivos. Representan el mecanismo efector de la destrucción celular, distinguiéndose dos grandes grupos: caspasas activadoras (28) y caspasas efectoras (29, 30). Se han identificado gran número de caspasas, siendo las caspasas 3, 8 y 9 las que están más íntimamente relacionadas con los fenómenos de muerte celular programada.

Las caspasas activadoras y efectoras a través de sus efectos sinérgicos actúan en cascada (31), siendo la activación de las caspasas efectoras el desencadenante de los cambios funcionales y morfológicos típicos de la apoptosis: la detención del ciclo celular, la alteración en la reparación del ADN, la inhibición del factor inhibidor de la apoptosis (XIAP) y la desestructuración del citoesqueleto celular.

- **Papel del Complemento**

El proceso de IR induce la activación del complemento y la formación de importantes mediadores de la inflamación que pueden alterar la homeostasis vascular, así como favorecer la adhesión celular leucocito-endotelial. Cabe destacar las anafilotoxinas C3a y C5a y los componentes del complemento iC3b y C5b-9 (32).

1.1.1.5 METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Diversos investigadores han demostrado que el óxido nítrico puede ejercer efectos protectores (33, 34) y deletéreos en la homeostasis vascular (35, 36). En condiciones fisiológicas, los efectos beneficiosos incluyen mecanismos protectores como la vasodilatación arterial y la actividad antitrombótica resultante de la inhibición plaquetaria. Por el contrario, los efectos deletéreos del NO se manifiestan en situaciones patológicas que inducen una producción desmesurada, constituyendo un componente importante en la fisiopatología del DIR (37, 38).

El óxido nítrico es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido L-arginina en presencia de oxígeno. Se identifican tres isoformas distintas de NOS: NOS neuronal (nNOS o NOS 1), NOS endotelial (eNOS o NOS3) y NOS inducible (iNOS o NOS 2). La eNOS y la nNOS se expresan de forma constitutiva y son calcio-dependientes, la iNOS es calcio-independiente y por ello se expresa únicamente con la estimulación celular (Fig. 4) (39, 40).

Se ha demostrado que las citoquinas y el NFκB estimulan directamente la síntesis de iNOS, la cual ha sido implicado en la patogénesis del síndrome de IR, en el choque y en la inflamación (1, 37, 38).

Durante el proceso de IR tiene lugar una producción excesiva de NO, la cual se relaciona con la estimulación de la iNOS en el momento de la reperfusión (41). Se ha comprobado que la administración de NO durante la fase de isquemia ejerce un efecto protector en el DIR (42), mientras que su administración durante el proceso de reperfusión se asocia a una disfunción endotelial y a un aumento de las permeabilidad vascular (43).

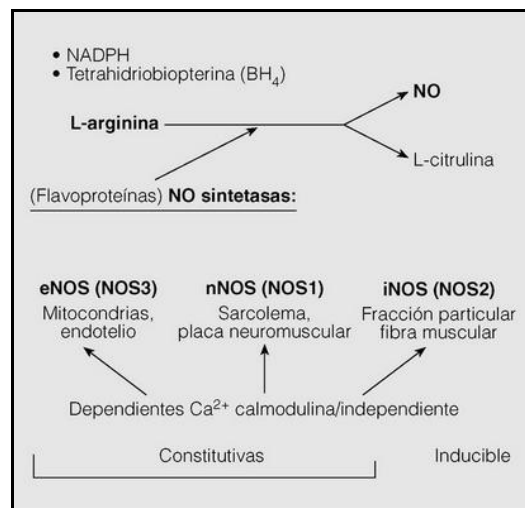


Fig. 4: Metabolismo del Óxido Nítrico

1.1.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DIR

El proceso de IR puede inducir una amplia gama de manifestaciones clínicas. Algunos factores de riesgo cardiovascular tales como la diabetes, la hipertensión y la hipercolesterolemia aumentan la vulnerabilidad de la microvascularización al DIR (1).

En el tejido cardíaco el DIR puede manifestarse de dos formas, el aturdimiento miocárdico y las arritmias de reperfusión. El aturdimiento miocárdico consiste en una disfunción miocárdica temporal que en determinados casos puede requerir soporte inotrópico. Las arritmias de reperfusión son frecuentes en pacientes sometidos a revascularización miocárdica y terapia trombolítica.

El daño en el sistema nervioso central viene caracterizado por edema cerebral y un aumento de la presión intracraneal (44), manifestándose clínicamente como una disminución del nivel de conciencia, empeoramiento de la función motora y cognitiva e incluso la muerte.

En el sistema gastrointestinal el DIR conlleva a una disfunción de la barrera de protección intestinal, produciéndose un aumento de la permeabilidad intestinal y una translocación bacteriana hacia la circulación sistémica y portal (45).

La isquemia de una extremidad se acompaña de edema postisquémico, hecho que empeora su estatus isquémico debido a la compresión capilar. La reperusión del miembro isquémico se acompaña de mioglobinuria y fallo renal, anemia, hipercalemia, hipocalcemia, hiperfosfatemia, trombocitopenia, uremia y acidosis metabólica (46, 47).

Situaciones tales como la cirugía de resección hepática, el trasplante hepático y los estados de hipoperfusión sistémica inducen una IR hepática (48). El síndrome por reperusión hepática se ha definido como una caída en el 30% de la presión arterial media (PAM) que persiste durante un tiempo superior a un minuto y que aparece a los cinco minutos aproximadamente de la implantación del injerto. La incidencia estimada de dicho síndrome es del 4-30% de los procedimientos (49). Otro dato característico junto a la hipotensión es la elevación de los niveles séricos de la ALT (alanina aminotransferasa), indicador de daño hepatocelular.

El daño pulmonar asociado al proceso de IR adquiere especial relevancia en el contexto del trasplante pulmonar. Constituye la principal causa de fallo primario del injerto, relacionándose a corto plazo con un aumento del riesgo de rechazo agudo, y a medio y largo plazo con el desarrollo de una bronquiolitis obliterante (rechazo crónico) (50). En el apartado isquemia-reperusión pulmonar se desarrolla la fisiopatología del DIR pulmonar y sus efectos dañinos sobre el parénquima pulmonar.

1.1.3 MODELOS EXPERIMENTALES Y CLÍNICOS DE DIR

Los procesos de isquemia y reperfusión inducen inflamación y daño tisular local en distintos órganos. Además de sus efectos locales, la IR se relaciona con una respuesta inflamatoria sistémica que resulta en el daño de órganos remotos (51). Los efectos remotos de la IR pueden ser más nocivos que sus efectos locales llegando incluso a desencadenar un síndrome de disfunción orgánica múltiple (52).

Un ejemplo lo constituye la IR intestinal, la cual ha sido identificada como desencadenante de un fallo orgánico remoto (53, 54). El hígado parece ser el primer órgano remoto que sufre los efectos nocivos de la IR intestinal. Se ha comprobado experimentalmente que la oclusión de la arteria mesentérica superior seguida de su reperfusión produce daño hepático directo (15, 55). Las células de Kupffer jugarían un rol importante en el daño hepático, contribuyendo activamente a la modulación de la respuesta inflamatoria aguda mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (56, 57) y mediadores químicos tales como IL-1, IL-6, TNF α , PAF (58, 59). De hecho, la administración de gadolinio (inhibe las células de Kupffer) y de antagonistas de PAF y de TNF α atenúan la respuesta hepática a la IR intestinal (60, 61).

Diversos estudios clínicos demuestran un daño hepático en pacientes que sufren una IR de miembros inferiores (51, 52, 62), el cual sigue un patrón similar al observado en el propio proceso de IR hepática (62, 63). Dicho daño hepático se manifiesta como un cuadro de colestasis, hipoalbuminemia, aumento de la concentración sérica de ALT, focos de necrosis e infiltrados de PMN (64, 65). Estudios experimentales en ratas demuestran que la IR de miembros inferiores también induce una alteración intestinal (66) que conduce a la liberación de endotoxinas al torrente circulatorio (67) desencadenando un cuadro de inflamación sistémica (68). *Yassin et al* (52) comprobaron en su modelo de IR de miembros inferiores en ratas una respuesta inflamatoria sistémica representada por un incremento significativo en los niveles de TNF α e IL-6.

Diversos estudios clínicos describen los complejos mecanismos de interferencia entre el riñón isquémico y órganos tales como el pulmón, el hígado, el corazón, el intestino, el sistema nervioso central y el sistema hematológico (Fig. 5).

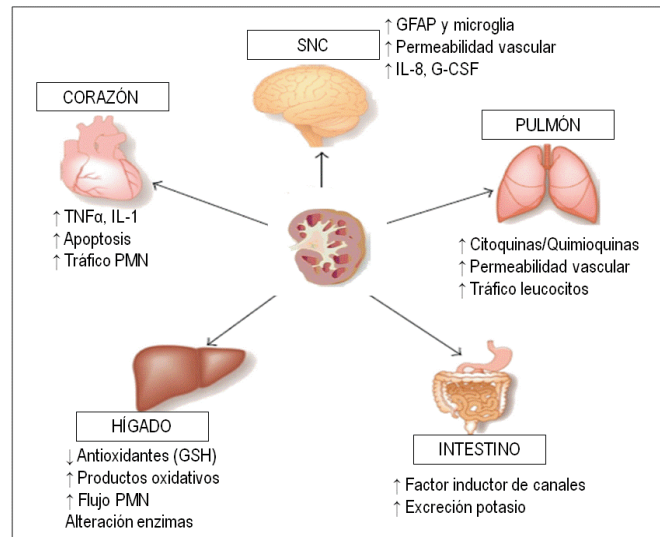


Fig. 5: Síndrome IR renal

A pesar de que la IR puede afectar a múltiples órganos, el pulmón y el hígado parecen ser especialmente vulnerables a los efectos deletéreos de la IR (69).

El daño hepático asociado a la IR constituye un problema de alta magnitud que se asocia a diversas situaciones clínicas tales como el choque, el traumatismo, la cirrosis, la cirugía de resección hepática y el trasplante (70, 71). Se ha demostrado que el daño hepático en el seno del proceso de IR responde a un patrón bifásico, diferenciándose una etapa temprana y otra tardía. La etapa temprana tiene lugar en las primeras horas de la reperfusión (2 a 6 horas), y el daño hepatocelular parece relacionarse con la formación de especies reactivas de oxígeno. La etapa tardía ocurre a las 18-24 horas del inicio de la reperfusión y es dependiente de la activación de neutrófilos (59, 72). En un estudio experimental de IR hepática en ratas (73) se comprobó la existencia de muerte celular por apoptosis en la etapa temprana de la reperfusión, y una elevación en la concentración sérica de la LDH, la ALT, la creatinina y la urea. Dichas

alteraciones indican que la IR hepática indujo un daño hepático local y efectos nocivos en órganos remotos (riñón).

Tradicionalmente se ha pensado que el sistema pulmonar era resistente al daño isquémico debido al doble aporte sanguíneo (bronquial y pulmonar) y al suministro independiente de O₂ a través del espacio alveolar (74). No obstante, la realidad es que membrana alveolo-capilar es una estructura anatomo-funcional extremadamente sensible al daño por IR (75). En el siguiente apartado definimos más extensamente el síndrome de isquemia-reperfusión pulmonar, explicando su fisiopatogenia y aportando evidencia mediante modelos experimentales y clínicos.

1.2 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR

Como se comenta previamente, se ha tenido clásicamente la idea de que el pulmón era indemne a los efectos de la IR por dos motivos: el doble aporte sanguíneo (bronquial y pulmonar) y el suministro de oxígeno alveolar (74). No obstante, diversas situaciones clínicas ponen de manifiesto la vulnerabilidad del parénquima pulmonar al proceso de IR: los acontecimientos traumáticos, la arterioesclerosis, el tromboembolismo pulmonar, la ventilación unipulmonar en el seno de una cirugía torácica (76), las resecciones pulmonares con angioplastia de arteria pulmonar (77, 78), el trasplante pulmonar convencional y el trasplante pulmonar lobar de donantes vivos (79).

Se ha demostrado que el daño pulmonar por IR eleva de forma significativa la morbilidad temprana tras un trasplante pulmonar y representa la segunda causa más importante de pérdida del órgano trasplantado (tras el rechazo inmunológico). El síndrome de IR, en el contexto del trasplante pulmonar, ocurre típicamente en las 72 horas postrasplante y se caracteriza por la aparición de daño alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia (80). Clínicamente varía desde un leve infiltrado radiológico, hasta un cuadro de distrés respiratorio del adulto (SDRA).

Durante la IR pulmonar, el daño asociado a la isquemia tisular se ve amplificado por el restablecimiento incompleto del flujo sanguíneo secundario a alteraciones vasculares postisquémicas (81, 82). Dichas alteraciones pueden incluir hipertensión pulmonar, hiperreactividad vascular, obstrucción vascular, derivación intrapulmonar, aumento de la permeabilidad vascular (edema pulmonar) y alteración de la ventilación-perfusión (1, 81, 83).

La respuesta vascular al daño por IR parece tener lugar en dos fases:

- La fase de isquemia se asocia a una escasez de oxígeno, daño celular y activación de enzimas citotóxicas, induciendo el cambio de metabolismo celular aeróbico a anaeróbico (84, 85).
- La fase de reperfusión viene caracterizada por la activación plaquetaria y neutrofílica, el daño endotelial, el aumento de la permeabilidad vascular, la liberación de citoquinas y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (86, 87).

Tras el restablecimiento del flujo sanguíneo, el daño asociado a la reperfusión de los tejidos isquémicos puede ser más severo que el producido por el desencadenante isquémico *per se* (87). Por tanto, el daño por IR pulmonar resulta de los efectos combinados de la isquemia y la reperfusión (87) e incluye tanto cambios en el metabolismo energético celular (88) como la producción de especies reactivas de oxígeno. Aunque algunos autores aseguran que el suministro de oxígeno procedente del espacio alveolar ayuda a mantener el metabolismo aeróbico y previene la formación de ERO (89, 90), otros han demostrado que la ausencia de flujo sanguíneo durante la ventilación pulmonar amplifica la formación de radicales libres de oxígeno (30, 91) y de especies reactivas de nitrógeno (92) a niveles tóxicos, induciendo daño molecular y celular.

El daño por IR pulmonar debe ser identificado de forma independiente, no estando causado únicamente por la disfunción endotelial secundaria a la escasez de oxígeno (93).

1.2.1 FISIOPATOGENIA DEL DAÑO POR IR PULMONAR

1.2.1.1 EFECTOS MICROVASCULARES DE LA IR PULMONAR

La reperfusión del tejido pulmonar post-isquémico viene caracterizada por una obstrucción progresiva de la microvascularización en relación a la formación de trombos intraluminales y a la vasoconstricción (86, 87).

La IR induce una rápida liberación de trombina y citoquinas proinflamatorias que modulan el tono vascular y modifican la respuesta inflamatoria mediante la regulación de la expresión de moléculas de adhesión (Fig. 6) (86, 94, 95). Este proceso conlleva a la adhesión plaqueto-endotelial y leuco-endotelial y a la formación de microembolias obstructivas en la trama capilar (96, 97). Además, las plaquetas y los neutrófilos activados pueden liberar mediadores tales como serotonina, tromboxano A₂ y factor de activación plaquetaria, lo que contribuye a la vasoconstricción y la formación de edema (98, 99).

1.2.1.2 ESTRÉS OXIDATIVO EN EL DAÑO POR IR PULMONAR. ESPECIES REACTIVAS DE O₂ (ERO)

De forma similar a otros lechos vasculares sistémicos, el DIR pulmonar se asocia a un estrés oxidativo (100, 101). Las especies reactivas de oxígeno son producidas por enzimas tales como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, y la óxido nítrico sintasa, encontrándolas en concentraciones elevadas en las células endoteliales (Fig. 6) (102).

Como se comenta previamente, en los tejidos hipóxicos tiene lugar una degradación de los fosfatos energéticos, lo que conduce a una acumulación de xantina e hipoxantina. Durante la ventilación pulmonar la interacción de la enzima xantina oxidasa con el oxígeno conlleva a la formación masiva de especies reactivas de oxígeno (ERO). El sistema citocromo p450 puede generar también especies reactivas de oxígeno, convirtiéndose en una importante fuente de O₂⁻ derivado del endotelio en los pulmones (103).

Durante el proceso de isquemia del tejido pulmonar ventilado, la enzima NADPH oxidasa es la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (88). La toxicidad de los metabolitos oxigenados liberados en respuesta a la estimulación de plaquetas, neutrófilos, macrófagos, y otras células constituye el mecanismo principal de daño pulmonar (104).

Las especies reactivas de oxígeno ejercen diferentes acciones en el tejido pulmonar, destacando la contracción del músculo liso, la interacción con enzimas redox, la proliferación celular y la transcripción de genes (102, 105, 106). Inducen además daño endotelial por peroxidación lipídica de sus membranas (29, 107, 108) y disregulación del NO comprometiendo la relajación endotelial (109, 110). Por otra parte, la superproducción de superóxido antagoniza los efectos de los donantes de NO (111), y promueve la formación de agentes inflamatorios por peroxidación lipídica y el reclutamiento de leucocitos activados en el tejido postisquémico (87).

1.2.1.3 PAPEL DE LOS LEUCOCITOS Y LAS PLAQUETAS EN LA IR PULMONAR

Diversos estudios experimentales han demostrado que los leucocitos activados juegan un papel fundamental en el daño pulmonar por IR (Fig. 6) (112). En análisis posteriores se ha formulado la teoría del patrón bimodal del daño por IR, con una primera fase neutrófilo-independiente seguida de otra fase mediada por neutrófilos (112, 113).

Durante la reperfusión, las plaquetas participan activamente en la hipoperfusión sistémica postisquémica (114) mediante la generación de una congestión capilar que promueve la hemostasis y la formación de microtrombos (96, 115, 116). Además, las plaquetas se adhieren al endotelio vascular postisquémico y causan daño tisular mediante la liberación de radicales libres y mediadores inflamatorios (117).

1.2.1.4 PAPEL DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA IR PULMONAR

Las moléculas de adhesión parecen jugar un importante papel en el DIR. El grupo de las selectinas sería el responsable de la adhesión inicial de las plaquetas y los leucocitos, mientras

que las integrinas estarían involucradas en la adhesión firme a las células endoteliales (Fig. 6) (118). Se ha comprobado experimentalmente que el bloqueo de dichas moléculas de adhesión puede reducir el daño por reperfusión pulmonar (119).

1.2.1.5 PAPEL DEL NO EN LA IR PULMONAR

El NO juega un papel importante en el proceso de IR pulmonar debido a su elevada reactividad (120). Aunque las tres isoformas de la NOS se expresan en el tejido pulmonar, la producción de NO durante la IR pulmonar se atribuye a la iNOS. La iNOS se hace visible en las dos primeras horas de la reperfusión pulmonar y adquiere unos niveles máximos entre las cuatro y seis horas (39, 40), habiéndose asociado además con el síndrome de distrés respiratorio agudo y con el daño pulmonar (121).

El incremento en el flujo de NO implica la inhibición de la enzima citocromo oxidasa resultando en un incremento de ERO y la consecuente formación de peroxinitrito (122, 123). Por otra parte la acumulación de NO induce la sobreexpresión de P-selectina, produciéndose interacciones entre la pared vascular y las plaquetas circulantes. La magnitud de dichas interacciones es directamente proporcional a la duración de la isquemia (Fig. 6) (124).

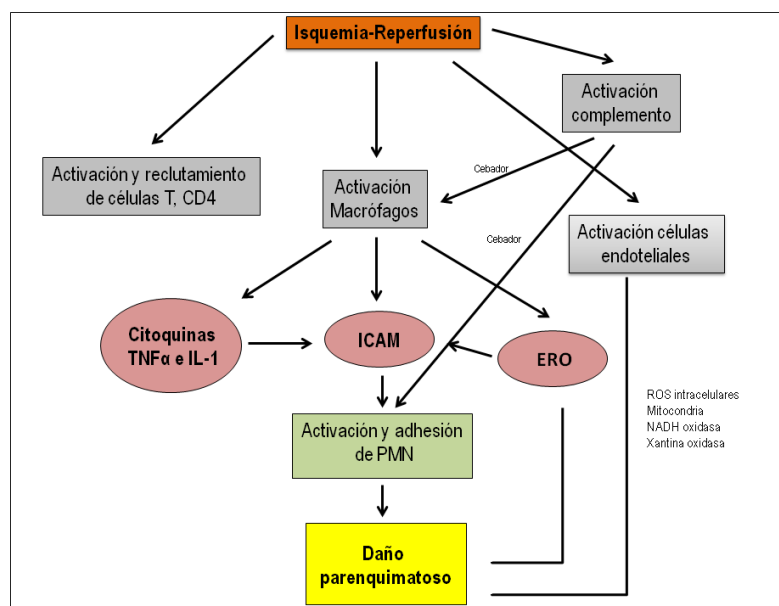


Fig. 6: Esquema de respuesta inflamatoria por isquemia-reperfusión

1.2.1.6 SISTEMA HEMO-OXIGENASA

El sistema de la enzima hemo-oxigenasa (HO) constituye un mecanismo fisiológico, que activado por la acumulación tisular de ERO, confiere protección a los tejidos y particularmente al pulmón frente a los efectos deletéreos del estrés oxidativo.

La HO pertenece al grupo de las proteínas de choque térmico (HSP). La isoforma constitutiva de esta enzima (HO-2) es expresada por diversos tejidos en condiciones basales, mientras que la isoforma inducible (HO-1) sólo aparece en situaciones de estrés, hipoxia, inflamación e IR (125).

1.2.2 MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO POR IR PULMONAR

En la práctica clínica encontramos diversas situaciones que requieren someter al parénquima pulmonar a períodos más o menos prolongados de isquemia normotérmica o caliente. Dichas situaciones son la resección pulmonar con angioplastia de la arteria pulmonar (77, 78, 126) y el trasplante lobar de donante vivo. Menos frecuentes son la extirpación pulmonar *ex situ* de tumores centrales con reimplantación del lóbulo o los lóbulos viables (127).

Recientemente, se ha demostrado que la ventilación unipulmonar (VUP) que acompaña a la mayoría de las cirugías torácicas induce un daño pulmonar por IR. La VUP prolongada (> 1 hora) es considerada como una causa potencial de complicaciones cardiopulmonares a través de la producción de estrés oxidativo severo durante la reexpansión pulmonar (76).

La mayoría de los estudios publicados sobre preservación del tejido pulmonar sometido a procesos de IR son realizados en modelos clínicos o experimentales de trasplante pulmonar con isquemia fría (128). En las situaciones clínicas descritas previamente, el tejido pulmonar sufre un tiempo variable de isquemia normotérmica o caliente, lo que obliga a la búsqueda de modelos experimentales en los que la isquemia es iniciada sin preservación pulmonar previa.

A continuación se detallan los diferentes tipos de isquemia descritos:

- Isquemia caliente: sucede con la interrupción del flujo sanguíneo, manteniéndose la temperatura del órgano al mismo nivel que la que tiene en condiciones fisiológicas.
- Isquemia fría: se desarrolla con el injerto fuera del organismo a una temperatura de 4°C, consiguiéndose enlentecer el metabolismo del órgano antes de su reimplante. La isquemia fría resulta necesaria para conseguir un adecuado mantenimiento del órgano desde que se realiza su extracción hasta su posterior reimplante en el receptor (129). La hipotermia disminuye la tasa metabólica y la destrucción de componentes celulares esenciales, no obstante también induce la activación de mediadores inflamatorios.
- Isquemia normotérmica (tibia): empieza a desarrollarse a raíz de la aparición de los donantes en asistolia y consiste en la preservación in situ del injerto a una temperatura de 12-14°C durante el menor tiempo posible (130).

En este contexto, el autotrasplante pulmonar representa un modelo de IR pulmonar normotérmica que tiene aplicación clínica en las situaciones citadas anteriormente. Como se comenta, los modelos experimentales estándar que estudian el proceso de IR se acompañan con el enfriamiento progresivo del órgano. Las conclusiones de estos trabajos no pueden ser aplicadas a las situaciones clínicas descritas, en las que el período de isquemia tiene lugar sin enfriamiento del órgano y sin sustitución de la sangre por una solución de preservación (131).

Paralelamente, la mayor parte de los estudios de isquemia normotérmica se realizan mediante técnicas de oclusión vascular en roedores (132) y no incluyen procedimientos quirúrgicos que imiten la práctica clínica en humanos.

El autotrasplante pulmonar en grandes mamíferos ha sido descrito en perros (133), ovejas (134) y cerdos (135).

Por ello el autotrasplante pulmonar en cerdos que se plantea cumple en gran medida este objetivo y se fundamenta en la utilidad clínica.

1.3 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El restablecimiento del flujo sanguíneo tras un determinado tiempo de isquemia resulta en daño tisular y orgánico. El período crítico de isquemia difiere en función del órgano: hígado y riñón (15-20 minutos) (136), músculo esquelético (150 minutos) (137), y cerebro (5 minutos). En el caso concreto del pulmón, se ha comprobado experimentalmente que es tolerable una isquemia caliente de hasta 2 horas sin repercusión en el intercambio gaseoso (138). Se han propuesto diversas medidas experimentales para intentar mitigar y prevenir el daño por IR. Uno de los métodos que ha mostrado mayor efectividad en la prevención del DIR es el preconditionamiento isquémico (PI).

El concepto de PI se basa en el hecho de que la exposición repetida de los tejidos a breves períodos de isquemia o hipoxia, puede protegerlos frente a los efectos perjudiciales de la isquemia prolongada y posterior reperfusión. De esta forma, el órgano diana es condicionado previamente al evento isquémico con la finalidad de reducir la extensión del daño derivado de la privación de oxígeno y nutrientes.

El PI fue descrito inicialmente por *Murry et al* en 1986 al descubrir que breves períodos de IR en el corazón canino ejercían un efecto protector en el miocardio frente al daño isquémico (139). Posteriormente este fenómeno fue investigado en diferentes tejidos y órganos mediante diversos modelos experimentales en grandes mamíferos. Recientemente, el PI se ha relacionado con una reducción del riesgo de arritmias durante el postoperatorio de pacientes sometidos a cirugía de *by-pass* aortocoronario (140) y con una disminución del riesgo de daño hepático en pacientes a los que se le realizó cirugía de resección hepática (141). El PI puede ser farmacológico o mecánico. A su vez, el PI mecánico puede ser directo o indirecto (142).

1.3.1 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CLÁSICO O DIRECTO

El PI directo consiste en la aplicación de breves períodos de IR en el mismo órgano que va a ser sometido a un tiempo de isquemia prolongado. El PI ha demostrado su eficacia en la protección frente al daño por IR en diversos órganos: el corazón, el hígado, el cerebro, el riñón y el músculo esquelético. No obstante, todavía no está totalmente determinado el papel del PI en el síndrome de IR pulmonar (143-145). Es posible que el PI constituya una herramienta muy eficaz para modular el daño por IR a ese nivel.

Actualmente hay suficiente evidencia para asegurar que el PI se manifiesta como una respuesta adaptativa bifásica (Fig. 7):

- La fase precoz comienza en el momento de la reperusión y sus efectos se mantienen durante tres o cuatro horas (146). La fase precoz se relaciona con la liberación de sustancias endógenas, habiéndose demostrado su asociación con la activación de la adenosina y agonistas $\alpha 2$ -adrenérgicos. Dicha activación está mediada por proteínas G sensibles a la toxina pertussis, estimulando a su vez a la fosfolipasa C o D para posteriormente activar a la proteína quinasa C (PKC). Los efectos beneficiosos de la fase precoz del PI pueden deberse a la fosforilación de los canales de K_{ATP} (147) por parte de la PKC. El hecho de que la protección ofrecida por el PI pueda ser abolida a través de antagonistas de los canales de K_{ATP} , y que a su vez los agonistas de dichos canales reproducen sus efectos da soporte a dicha hipótesis (147, 148). Paralelamente, el PI conlleva a la translocación de la 5'-nucleotidasa dependiente de la PKC a la superficie de la celular, lo que conduce a un incremento de la producción de adenosina y de las reservas energéticas celulares, así como a la reducción de la adherencia leucocitaria (147).

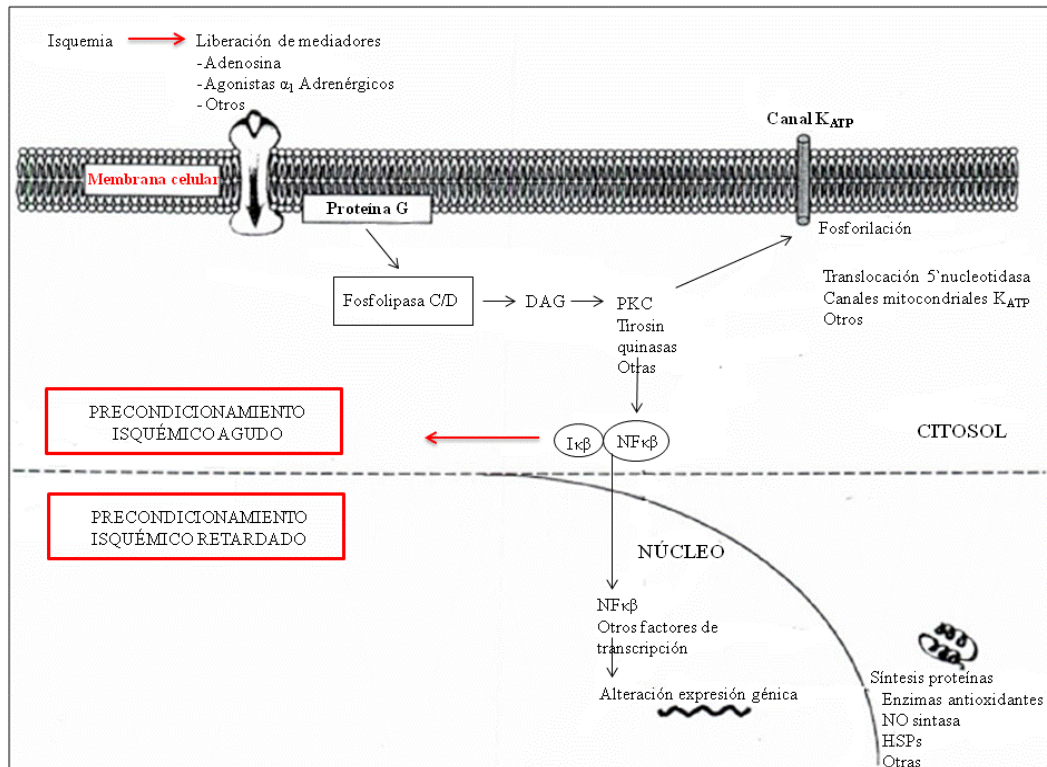


Fig. 7: Mecanismos responsables del preconditionamiento isquémico agudo y retardado

La fase tardía del PI tiene su inicio a las 12-24 horas tras la reperusión y sus efectos son más duraderos (días). La fase tardía parece corresponder a una respuesta adaptativa de la alteración en la expresión genética y en la síntesis de proteínas tales como enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico y NOS. Parece ser que la activación de la PKC y otras proteínas de la familia quinasa podrían estar relacionadas en dicho proceso. El factor de transcripción nuclear (NF κ B) también se ha visto implicado en la fase tardía del PI tal y como se ha observado en cultivos de células endoteliales (149). De hecho, la activación y translocación nuclear de dicha proteína citosólica (NF κ B) inicia la transcripción de genes relacionados con la respuesta inflamatoria post-isquémica. Además, la inhibición de la translocación del NF κ B durante el evento isquémico inicial en cultivos celulares bloquea el preconditionamiento isquémico retardado (PIR).

1.3.1.1 MOLÉCULAS RELACIONADAS CON PI

- **Adenosina**

La adenosina es una hormona ampliamente distribuida en los diferentes tejidos y órganos. Su síntesis tiene lugar en las células miocárdicas y endoteliales.

Sus efectos son: vasodilatación (69), inhibición de la agregación de neutrófilos y de la función plaquetaria (150) y producción de radicales libres.

Parece ser que la enzima CD73 (clúster de diferenciación 73) es la principal vía de producción de adenosina. De hecho, el PI miocárdico se asocia con un incremento de la actividad CD73 y del metabolismo de la adenosina (151). Diversos estudios señalan a la adenosina como molécula mediadora de la fase temprana y tardía del PI a través de su interacción con diferentes receptores en órganos tales como el corazón (receptor A1) y el hígado (receptor A2) (152).

- **Óxido Nítrico (NO)**

Diversos estudios centrados en el PI demuestran que el NO modula la perfusión microvascular a través de su efecto vasodilatador (153) y de sus acciones antiinflamatorias (153-156). El NO juega un papel fundamental en la fase precoz y en la fase tardía del PI. La fase precoz está mediada por la isoforma eNOS mediante la síntesis de cGMP (157), la posterior inhibición de los niveles de cAMP, y la reducción en las demandas energéticas. La fase tardía es dependiente de la síntesis de proteínas a través de la activación de PKC, NFκB y la transcripción de la isoforma iNOS.

Se ha demostrado que el NO ejerce un factor protector en múltiples órganos. Por ejemplo en el hígado, el NO actúa como mediador en el PI mediante la inhibición de la endotelina (158) y la activación de los receptores A₂ de la adenosina (152). No obstante y tal y como se comenta en apartados previos, el NO tiene un efecto dicotómico. La producción de pequeñas

cantidades de NO por la isoforma eNOS reduce el daño por IR, mientras que su sobreproducción por la activación de la isoforma iNOS se asocia a efectos deletéreos.

- **Citoquinas**

Se ha comprobado que la activación del NFκB tras el PI de miembros inferiores en ratas indujo una respuesta adaptativa en el corazón (159). El aumento de la expresión de iκB (inhibidor fracción κB) atenuó la activación del NFκB tras la IR y redujo la magnitud del infarto en el miocardio.

El TNFα es otra molécula íntimamente relacionada con el PI, de hecho parece ser que la etapa retardada del PI es TNFα dependiente (160). También se ha comprobado experimentalmente que el PI hepático reduce los niveles de TNFα (161).

El PI se ha asociado al bloqueo de otros mediadores inflamatorios como son las IL-6 e IL-1β, y los neutrófilos circulantes. Dicho bloqueo confirió protección pulmonar frente al síndrome de IR (162).

- **PKC**

Wolfrum et al mostraron que el aumento plasmático de bradiquinina tras el PI mesentérico se asoció con la activación de las PKC miocárdicas, sugiriendo que dicha activación es un paso decisivo en la conferencia de cardioprotección (163).

- **Bradiquinina**

Shoemaker et al (164) demostraron que el PI mesentérico induce un incremento en los niveles endógenos de bradiquinina, lo que se asocia con un efecto protector sobre el corazón.

- **Catecolaminas**

El PI se relaciona con un incremento de los niveles cardiacos y basales de norepinefrina (165). La administración de reserpina, que induce un bloqueo simpático, reduce la síntesis de catecolaminas abolviendo los efectos protectores del PI (166).

- **Opioides**

Se ha visto que el PI se asocia a un aumento en la concentración de opioides endógenos. Parece ser que los opioides actúan sobre receptores delta ($\delta 1$) en los órganos diana, lo cual ha sido comprobado en el corazón, músculo esquelético e intestino (167-169). La activación de dichos receptores induce efectos similares a los producidos por el PI.

- **Radicales libres**

Estudios basados en PI han demostrado que los radicales libres dan lugar a la liberación de moléculas inductoras tales como el NO, las catecolaminas, la adenosina, y la bradiquinina a través de la activación de las kinasas intracelulares (170).

Chen et al (171) mostraron que los radicales libres indujeron la elevación de proteínas de choque térmico y la actividad antioxidante mitocondrial, hechos que ayudaron a mantener la función mitocondrial reduciendo la apoptosis. Los niveles de radicales libres deben ser cuantificados, pues como se vio previamente, su acumulación deliberada inicia la cascada de eventos dañinos de la IR.

- **Canales K_{ATP}**

Los canales K_{ATP} participan activamente en el PI, de hecho la apertura de dichos canales y la instauración de flujo iónico a su través juega un papel como iniciador (172), como mediador y como efector final (169) en el PI.

- **Prostaglandinas**

El PI intestinal se ha relacionado con un aumento en la producción de PGE₂, lo que sugiere que el incremento de la actividad endógena de las prostaglandinas podría estar envuelto en el PI. *Brzozowski et al* (173) demostraron que los inhibidores de la ciclooxigenasa (indometacina y el rofecoxib) abolieron los efectos protectores del PI, mientras que el tratamiento con PGE₂ exógeno contrarrestó sus efectos y restauró los efectos protectores del PI.

- **Proteínas de choque térmico y la hemo-oxigenasa 1 (HO-1)**

Otro mecanismo adaptativo al estrés celular es la expresión de proteínas de choque térmico (HSPs), las cuales constituyen una familia de proteínas que contribuyen al mantenimiento e integridad estructural celular. Dentro de este grupo, la HO-1 ha demostrado jugar un papel importante en el PI (174), al reducir experimentalmente el daño hepático por IR mediante la prevención de la apoptosis hepática y el déficit de perfusión microvascular (175).

1.3.2 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO INDIRECTO O REMOTO

Se ha demostrado que el preconditionamiento isquémico previene o mitiga los efectos dañinos de la IR. En apartados previos se habla de la protección ofrecida por el PI a nivel local, es decir en el órgano preconditionado. No obstante, diversos estudios demuestran que el PI es capaz de ofrecer también protección remota a diversos órganos (176).

El hecho de que breves y repetitivos períodos de IR de un órgano ejerza protección en órganos remotos ha sido motivo de estudio por numerosos autores, surgiendo el concepto de PI remoto o indirecto. Muchos de ellos coinciden en que el PI remoto o indirecto representa una herramienta quirúrgica novedosa y simple en la prevención de los efectos deletéreos de la isquemia cardiaca, hepática o cerebral. *McClanahan* en 1993 fue el primero en hablar del PI remoto, al comprobar que breves períodos de IR renal en conejos confirieron protección miocárdica frente a un período de isquemia prolongada. Parece ser que la protección ofrecida

por el PI remoto se debe tanto a la liberación de mensajeros bioquímicos al torrente circulatorio (vía humoral), como a la activación de vías nerviosas (vía neuronal).

En modelos experimentales animales se ha visto que breves períodos de IR en las extremidades inferiores, intestino, mesenterio o riñón protegen al miocardio de los efectos deletéreos de la isquemia prolongada. Paralelamente en humanos, el PI del tejido musculoesquelético ha sido utilizado para ejercer protección al miocardio (166).

Recientemente se ha demostrado en un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdos que el PI atenuó el daño pulmonar por IR (177). No obstante, todavía queda por esclarecer los efectos del PI pulmonar sobre órganos remotos como por ejemplo el hígado.

1.3.3 MODELOS EXPERIMENTALES Y CLÍNICOS DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

En la literatura médica disponemos de numerosos estudios centrados en la investigación de las medidas y maniobras profilácticas y terapéuticas para prevenir el daño asociado al proceso de IR. El PI constituye una herramienta quirúrgica que ha sido investigada en profundidad durante muchos años y que ha demostrado reducir el daño por IR y sus consecuencias sistémicas (142).

Para el estudio del PI se han utilizado múltiples modelos experimentales basados en la oclusión de estructuras vasculares principales, bien mediante oclusión directa, o mediante la aplicación de un torniquete externo. La mayoría de los modelos experimentales han sido desarrollados en el corazón e hígado (173, 178, 179), riñón (180-182) y, sobretudo, en miembros inferiores (162, 165, 166, 183-185). El principal foco de investigación ha sido históricamente la protección miocárdica. Los modelos experimentales se han llevado a cabo sobre todo en roedores y conejos, siendo menores los estudios en grandes mamíferos como cerdos (162, 166, 184), ovejas (185) o perros (139).

Aunque en menor número, también podemos encontrar modelos clínicos de PI en la literatura. La mayoría se han desarrollado mediante la oclusión transitoria de los miembros inferiores con torniquete, hallándose protección miocárdica (166) y mejora de la función pulmonar (186).

Aunque el PI parece que aumenta la tolerancia isquémica de los órganos y tejidos, su eficacia es dependiente del número de ciclos y de la duración de los mismos. En los distintos estudios experimentales y clínicos citados se han aplicado diferentes formas de PI, habiendo resultado la inmensa mayoría eficaces. El establecimiento de los ciclos de PI y su duración debe depender también del órgano en cuestión pues, como se habla previamente, cada órgano y tejido presentan una tolerancia isquémica diferente.

Recientemente, se ha comprobado el papel del PI en la prevención del daño por IR pulmonar (177) a través de un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdos (135), modelo que imita situaciones clínicas de IR pulmonar normotérmica. No obstante, el papel del PI pulmonar en la prevención del daño remoto de otros órganos no está todavía bien definido.

2. HIPÓTESIS. OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS PRINCIPAL

El proceso de isquemia-reperfusión pulmonar induce una respuesta inflamatoria local y sistémica que conduce al daño pulmonar local y al daño de órganos remotos, particularmente el hígado. Sabemos que el preconditionamiento isquémico atenúa los efectos deletéreos de la IR pulmonar. Por ello, planteamos la hipótesis de que el preconditionamiento isquémico pulmonar mediante la aplicación de breves y controlados episodios de isquemia-reperfusión previos a la isquemia prolongada, tenga un efecto protector sobre la respuesta inflamatoria hepática secundaria al proceso de isquemia-reperfusión pulmonar.

2.2 HIPÓTESIS SECUNDARIAS

1. El autotrasplante pulmonar en cerdo constituye un modelo experimental de isquemia-reperfusión que imita situaciones de la práctica clínica y parece que hace posible estudiar el efecto modulador del preconditionamiento isquémico sobre el hígado.
2. El presente modelo experimental permite estudiar el daño hepático secundario a la isquemia-reperfusión pulmonar mediante la determinación de mediadores proinflamatorios en el tejido hepático.
3. El presente modelo experimental permite estudiar el daño hepático secundario a la isquemia-reperfusión pulmonar mediante la determinación del grado de apoptosis en el parénquima hepático.
4. El preconditionamiento isquémico pulmonar podría modular la respuesta inflamatoria y apoptótica en el hígado secundaria a la isquemia-reperfusión pulmonar.

2.3 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo general de este estudio fue investigar la respuesta inflamatoria hepática secundaria al proceso de isquemia-reperfusión pulmonar y su posible modulación mediante el preconditionamiento isquémico pulmonar.

2.4 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar un posible efecto de la isquemia-reperfusión pulmonar sobre la expresión de mediadores proinflamatorios en el hígado en un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdo.
2. Determinar si el cambio en la expresión de mediadores proinflamatorios se acompañó de modificaciones en el grado de apoptosis en el tejido hepático.
3. Estudiar la asociación de esta respuesta hepática con alteraciones hemodinámicas y gasométricas secundarias a la isquemia-reperfusión pulmonar.
4. Determinar el posible efecto beneficioso del preconditionamiento isquémico pulmonar sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica hepática secundaria a la isquemia-reperfusión pulmonar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 RESUMEN

Dos grupos (PI y CON) de diez cerdos de la raza *Large-White* fueron sometidos a un autotrasplante pulmonar ortotópico mediante neumonectomía izquierda, lobectomía craneal *ex situ*, reimplantación del lóbulo caudal y reperusión del mismo durante treinta minutos. Un tercer grupo compuesto por cinco animales fue sometido a cirugía simulada (grupo SHAM).

Durante el procedimiento se analizaron diferentes parámetros hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos con la finalidad de estudiar la respuesta hepática al síndrome de isquemia-reperusión pulmonar y la posible protección ofrecida por el preconditionamiento isquémico pulmonar.

3.2 MATERIAL

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO: ANIMALES

Para desarrollar el presente estudio se han empleado 25 cerdos de la raza *Large-White* de ambos sexos. La edad aproximada de los animales ha sido de tres meses con un peso comprendido entre 35 y 50 kilogramos. Los cerdos de la raza *Large-White*, o gran cerdo blanco inglés, son originarios del condado de *Yorkshire, Inglaterra*. En 1883 la raza *Large-White* fue registrada por la Asociación Nacional de Criadores de Cerdo. Se tratan de cerdos uniformemente blancos, de orejas tías y patas largas, y que presentan una elevada fertilidad y un rápido crecimiento. Son cerdos adaptados a la crianza al aire libre y en cautividad, constituyendo en la actualidad una de las razas porcinas más extendidas

Los procedimientos realizados con animales en este Proyecto de Investigación han sido aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEa) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), y se practicaron cumpliendo la normativa en vigor relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63/UE y RD 53/2013). La Unidad de Medicina y Cirugía Experimental (UMCE) del HGUGM, está incluida

en el Registro de Establecimientos de Cría, Suministradores y Usuarios de Animales para la Experimentación u otros Fines Científicos de la Comunidad de Madrid, como Establecimiento Usuario con el nº: ES280790000087. La manipulación de los animales ha cumplido con las normas sobre protección de los animales utilizados en experimentación aplicadas en la UMCE y ha sido realizada por personal acreditado con las Categorías B y/o C. En la dirección y el diseño del proyecto, se han seguido los principios de reducción, refinamiento y remplazo

3.2.2 APARATAJE Y MATERIAL FUNGIBLE

- **Transductores de presión**

Se han empleado transductores de presión desechables Abbott IBP (Abbott, Irlanda) para monitorizar las variables hemodinámicas.

- **Tubo endotraqueal**

Para la intubación orotraqueal se utilizaron tubos estándar del modelo Murphy con balón. El tamaño del tubo empleado (del número 5,5 al 7) dependió del peso y longitud del animal (Fig. 8).

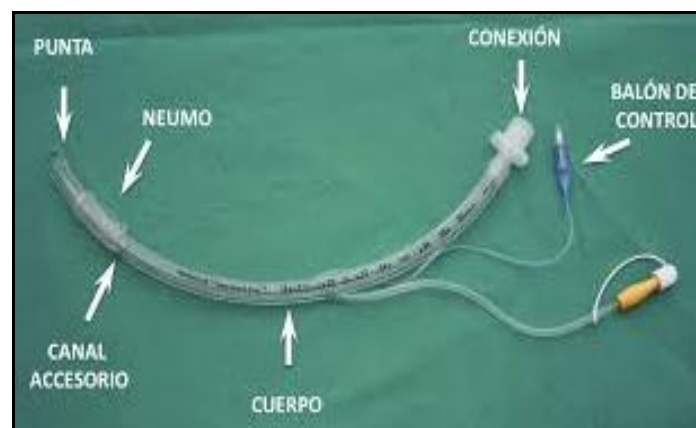


Fig. 8: Tubo endotraqueal

- **Catéteres vasculares**

La arteria femoral fue canalizada con un catéter vascular de 7,5 F, mientras que en la vena femoral se optó por un catéter de 9 F (Fig. 9).



Fig. 9: Catéter vascular

- **Catéter de Swan-Ganz o catéter de arteria pulmonar (CAP)**

Diseñado a principios de los años setenta por los doctores *William Ganz* y *Jeremy Swan*, su utilidad inicial fue el tratamiento y la monitorización de los infartos agudos de miocardio. Con el paso de los años se ha extendido su uso clínico a diversas patologías.

Este dispositivo permite monitorizar de forma continua la presión en la arteria pulmonar, medir la presión de enclavamiento pulmonar o presión capilar pulmonar (PCP) y estimar el gasto cardiaco por termodilución.

El catéter de *Swan-Ganz* empleado en el estudio es el de arteria pulmonar de triple conducto o termodilución. El tamaño es de 7 F con una longitud de 110 cm. En su extremo distal se encuentra un balón de látex, de 1,5 ml de capacidad de aire, cuyo inflado permite facilitar la progresión del catéter. El inflado del balón conduce a la obstrucción voluntaria del flujo sanguíneo en la rama de la arteria pulmonar en la cual se encuentra localizado, permitiendo la medición de las presiones distales a dicha obstrucción (Fig. 10).

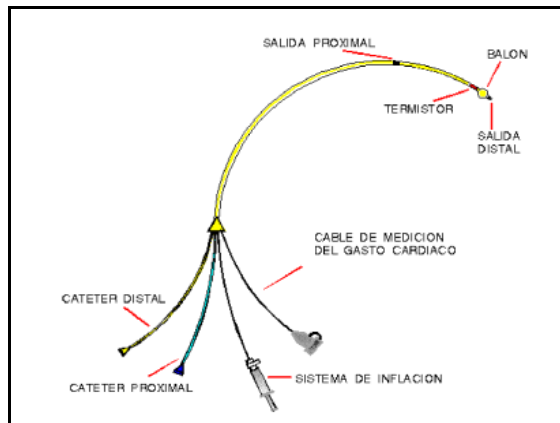


Fig. 10: Catéter de Swan-Ganz

- **Material suplementario**

- Catéter introductor de un diámetro de 9 F que facilita la entrada, retirada y recolocación del CAP.
- Material para la medición de presiones: alargaderas, conexiones rígidas y sistemas transductores de presión conectados a un monitor.
- Monitores de registro de presiones y de la curva de termodilución. Hoy en día incluyen el software necesario para el cálculo directo de los parámetros hemodinámicos derivados.

3.2.3 QUIRÓFANOS E INSTALACIONES

Todos los procedimientos anestésicos y quirúrgicos del presente estudio fueron realizados en el quirófano de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Fig. 11).



Fig. 11: Vista panorámica del quirófano

Las instalaciones del quirófano incluyen dos mesas quirúrgicas, cuatro lámparas quirúrgicas de alta intensidad y el equipo de instrumental quirúrgico estándar, además del material específico de cirugía torácica (Fig. 12).



Fig. 12: Mesa de instrumental quirúrgico

Respecto al equipamiento anestésico, el quirófano dispone de un respirador modelo Dräger SA 1 (Dräger Medical, Lübeck, Alemania) (Fig. 13), de un capnógrafo Ohmeda 5250 RGM (General Electric Health Care, USA) (Fig. 14), de un analizador de gases GEM Premiere 5000 (Fig. 15), de un monitor de *Swan-Ganz* de gasto continuo (Edwards, Irving, California, USA) y de un desfibrilador con palas externas e internas Life Pulse (HVE, Miami, USA) (Fig. 16).



Fig. 13: Respirador Dräger SA 1



Fig. 14: Capnógrafo Ohmeda



Fig. 15: Analizador de gases GEM Premiere



Fig. 16: Life Pulse

3.3 MÉTODOS

3.3.1 DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente experimento representa un modelo de isquemia-reperfusión pulmonar. El modelo consiste en la realización de un autotrasplante pulmonar y permite estudiar los efectos remotos en el hígado de la IR pulmonar mediante biopsias hepáticas. El grupo experimental de intervención terapéutica es sometido a maniobras de preconditionamiento isquémico.

Bajo anestesia general e intubación orotraqueal se realizó un autotrasplante pulmonar ortotópico mediante neumonectomía izquierda, lobectomía craneal izquierda *ex situ* y reimplantación del lóbulo caudal izquierdo.

Los animales de experimentación fueron randomizados en tres grupos: grupo control (CON; n = 10) en el que se realiza el procedimiento descrito en el apartado anterior; grupo experimental (PI; n = 10) en el que además de la cirugía descrita se llevan a cabo maniobras de preconditionamiento isquémico previas a la neumonectomía, mediante dos ciclos de cinco minutos de oclusión de la arteria pulmonar izquierda con un intervalo de perfusión de cinco minutos entre las dos oclusiones; y grupo SHAM (SHAM; n = 5) sometido a cirugía simulada (considerado el grupo control del control), esto es sin realizar resección pulmonar y sin las maniobras de preconditionamiento isquémico.

3.3.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Se establece un ayuno previo a la intervención de 18 horas para alimentos sólidos, permitiendo la ingesta de agua hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

La premedicación del animal consiste en la administración de una dosis única de ketamina 10 mg/Kg intramuscular ("Ketolar", Parke Davis, Pfizer, Dublin, Ireland), procediendo posteriormente a su traslado hasta el quirófano.

Una vez colocado en la mesa del quirófano, se procede a la canalización de un acceso venoso periférico (abbocath nº20) a nivel de la vena dorsal de la oreja para la inducción anestésica (Fig. 17). Paralelamente, el animal es monitorizado para obtener un registro electrocardiográfico continuo y una saturación periférica de oxígeno ($Sa O_2$), y es preoxigenado con oxígeno al 100%.



Fig. 17: Canalización vía periférica

La inducción anestésica se realiza mediante la perfusión intravenosa de fentanilo 3 μ g/kg ("Fentanest", Kern Pharmaceuticals, Houston, TX), propofol al 1% 4mg/kg ("Diprivan", AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire, UK) y atracurio 0,6 mg/kg ("Tracrium", Glaxo Smith Kline, Brentford, UK).

Tras la inducción anestésica se procede a la intubación orotraqueal del animal (tubo nº 5,5-7) y a la conexión del tubo a un respirador modelo Dräger SA 1 (Dräger Medical, Lübeck,

Alemania) (Fig. 18). Iniciamos una ventilación mecánica controlada por volumen con los siguientes parámetros: un volumen corriente de 8 ml/kg, una frecuencia respiratoria entre 12 y 15 rpm y una relación inspiración/expiración 1:2. El objetivo es mantener al animal en una situación de normocapnia (PaCO_2 entre 35-40 mmHg), por lo que los parámetros respiratorios pueden ser modificados si fuese necesario. La FiO_2 proporcionada a lo largo del experimento es de 1.



Fig. 18: Intubación Orotraqueal

En el mantenimiento anestésico se administra propofol al 2% a 8-10 mg/kg/h en perfusión continua intravenosa, empleando dosis suplementarias de fentanilo y atracurio si es preciso. También se mantiene una perfusión continua de cristaloides a 5-6 ml/kg/h, añadiendo sustancias coloides según requerimientos.

3.3.3 PROTOCOLO QUIRÚRGICO

- **Procedimientos invasivos previos**

Previamente a la intervención quirúrgica llevamos a cabo una serie de procedimientos invasivos: traqueostomía, accesos venosos y arteriales, cistostomía y laparotomía media.

Una vez colocado el animal en la mesa de quirófano se prepara el campo quirúrgico con una solución aséptica (povidona iodada).

El primer paso es la realización de una traqueostomía (Fig. 19), procediendo a la retirada del tubo orotraqueal y a la intubación a través del traqueostoma con un tubo de 6 mm. Este paso facilitará el avance y retirada del tubo traqueal en los momentos en que sea necesario establecer la ventilación unipulmonar.



Fig. 19: Traqueostomía

Previo disección quirúrgica del paquete vasculo-nervioso femoral se canalizan la vena y arteria femorales (Fig. 20), lo cual permite la realización de los estudios hemodinámicos y la extracción de las muestras sanguíneas durante el procedimiento quirúrgico.

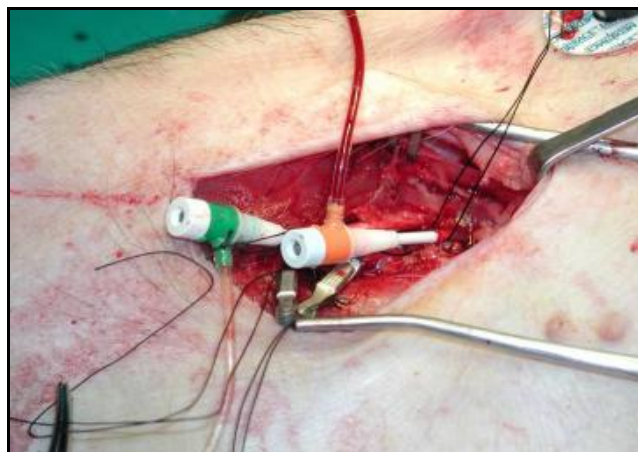


Fig. 20: Canalización vasos femorales

La uretra del cerdo tiene forma de sacacorchos, lo que imposibilita la inserción de una sonda vesical mediante el procedimiento convencional. Para solventar este problema, se

realiza una cistostomía suprapúbica a través de una minilaparotomía media (Fig. 21). La cistostomía permitirá controlar el ritmo de diuresis del animal durante la intervención.

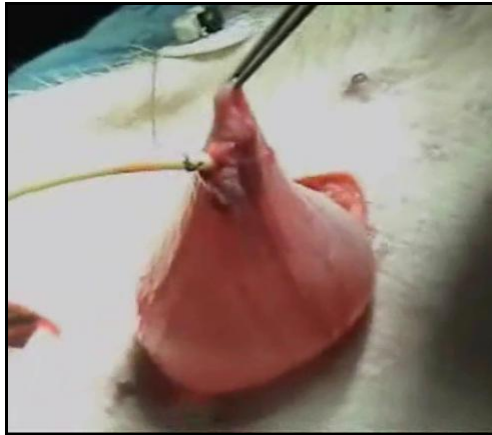


Fig. 21: Cistostomía

Antes de colocar al animal en decúbito lateral, realizamos una laparotomía media subxifoidea de unos 5 o 6 cm (Fig. 22). La realización de la laparotomía nos facilitará la posterior toma de biospias hepáticas.

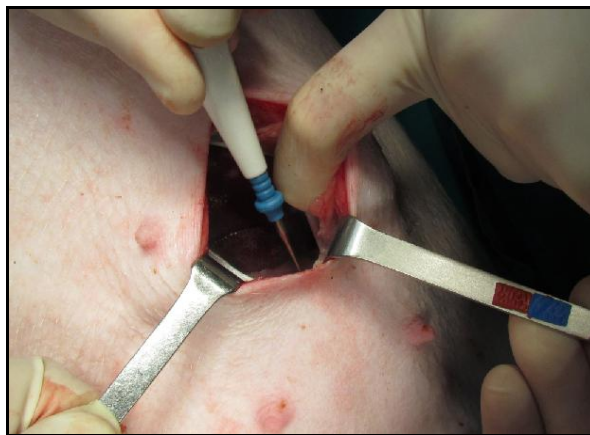


Fig. 22: Laparotomía media subxifoidea

- **Neumonectomía**

Una vez realizados los procedimientos preliminares, se coloca al animal en decúbito lateral derecho y se realiza una toracotomía anterolateral izquierda con costectomía de una costilla. A continuación se inicia la neumonectomía: disección de la vena ázigos, disección de la vena pulmonar craneal y de la arteria principal izquierda y disección de la vena pulmonar

caudal previa liberación del ligamento pulmonar. En el momento de la sección bronquial se inicia la ventilación unipulmonar (se disminuye el volumen tidal a 6 ml/kg para realizar ventilación protectora pulmonar) mediante la progresión del tubo endotraqueal hasta el bronquio intermediario derecho. Al mismo tiempo las estructuras vasculares (venas pulmonares y arteria pulmonar) son seccionadas y preparadas para facilitar la posterior anastomosis.

En el momento de la oclusión de la arteria pulmonar se procede a la heparinización sistémica mediante la administración de 300 UI/Kg (Mayne Pharma España, S.L) en bolo, para prevenir su trombosis durante la cirugía de banco.

- **Cirugía de banco**

La cirugía de banco consiste en la realización de una lobectomía craneal (Fig. 23). Previamente a ésta se perfunde el injerto a través de la arteria pulmonar (anterógradamente) y de las venas pulmonares (retrógradamente) con un litro de solución de la Universidad de Wisconsin a 10-15°C. Paralelamente se ventila el injerto mediante un resucitador manual conectado a un tubo endotraqueal (FiO₂ 21%). A continuación se completa la lobectomía craneal tras la sección de las ramas vasculares y la sutura del muñón bronquial.

El pedículo del lóbulo caudal que va a ser reimplantado lo constituyen la arteria pulmonar izquierda, la vena pulmonar caudal y el bronquio principal izquierdo.

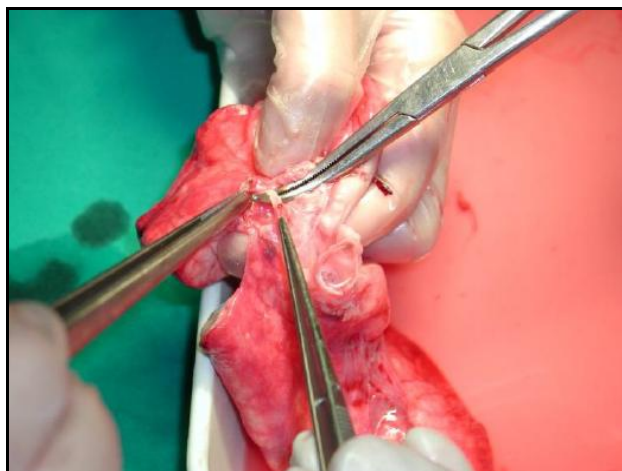


Fig. 23: Cirugía de banco

- **Reimplante**

El reimplante del lóbulo caudal se realiza mediante la anastomosis de los elementos broncovasculares. En el bronquio se realiza una anastomosis termino-terminal con una sutura continua con prolipropileno 4.0 ("Prolene", Ethicon, INC, Somerville, New Jersey, USA). En la anastomosis arterial termino-terminal se utiliza sutura continua con polipropileno 5.0 ("Prolene", Ethicon, INC, Somerville, New Jersey, USA), y en la anastomosis entre la vena pulmonar caudal y la aurícula izquierda se emplea una sutura continua con polipropileno 6.0 ("Prolene", Ethicon, INC, Somerville, New Jersey, USA).

- **Reperusión**

Tras el reimplante, el tubo endotraqueal es retirado hasta carina traqueal y se restablece la ventilación bipulmonar. Una vez comprobado que el lóbulo reimplantado ventila adecuadamente se inicia la reperusión, primero de forma retrógrada (despinzando la aurícula izquierda), y luego de forma anterógrada (despinzando la arteria pulmonar). La reperusión se mantiene durante 30 minutos, tras los cuales se procede a la eutanasia del animal con profundización anestésica e inducción de cardioplejía con cloruro potásico.

3.3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los 25 animales de experimentación fueron randomizados en tres grupos: grupo control (CON; n = 10), grupo experimental (PI; n = 10), y grupo SHAM (n = 5).

En el grupo control (n = 10) se realizó el protocolo quirúrgico descrito previamente. En el grupo experimental (n = 10) además de la cirugía se aplicó el preconditionamiento isquémico mediante dos periodos de oclusión de 5 minutos de la arteria pulmonar, intercalando 5 minutos de reperusión entre las dos oclusiones. El grupo SHAM (n = 5) corresponde al grupo de cirugía simulada, es decir sin realizar resección pulmonar ni preconditionamiento isquémico (Fig. 24).

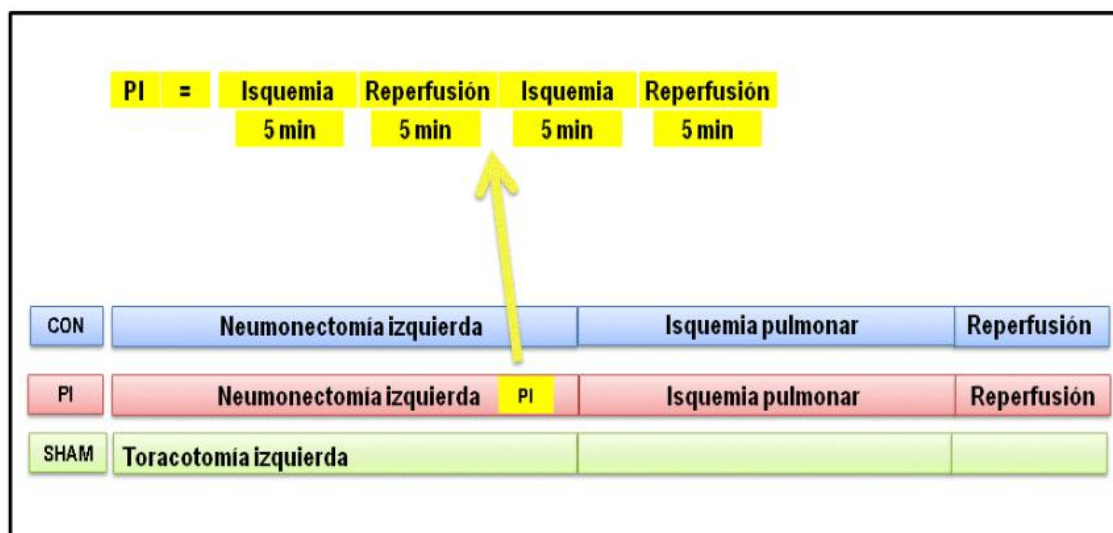


Fig. 24: Esquema diseño experimental

3.3.5 MOMENTOS DE MEDICIÓN Y TOMA DE MUESTRAS

Las mediciones y recogida de muestras se realizan en cinco momentos del experimento según se describe a continuación (Fig. 25):

- Basal (B): se realiza el estudio hemodinámico y se extrae una muestra de sangre arterial para obtener una gasometría arterial. Las mediciones basales se realizan pasados 30 minutos de la toracotomía, estando el animal bajo ventilación bipulmonar.
- Pre-neumonectomía (Pn): antes de completar la neumonectomía izquierda y una vez establecida la ventilación unipulmonar, se realiza otra gasometría arterial, un nuevo estudio hemodinámico y una biopsia hepática.
- Pre-reperusión (PRp): una vez reimplantado el lóbulo caudal y antes de iniciar la reperusión se vuelve a realizar otro estudio hemodinámico, se extrae una nueva gasometría arterial y se obtiene la segunda biopsia hepática.
- 10 minutos post-reperusión (Rp-10'): pasados 10 minutos del restablecimiento del flujo sanguíneo se repite el estudio hemodinámico, la gasometría arterial y se realiza la tercera biopsia hepática.

- 30 minutos post-reperfusión (Rp-30'): tras 30 minutos de reperfusión del lóbulo pulmonar caudal se vuelven a realizar las mismas mediciones que en los puntos previos y se obtiene la cuarta biopsia hepática.

En el grupo experimental, las mediciones y toma de biopsia hepática correspondientes al momento Pn son realizadas tras la aplicación de las maniobras de preconditionamiento isquémico.

En el grupo SHAM, en el que no se realiza la neumonectomía izquierda, los momentos anteriores se corresponden con los siguientes tiempos: basal (igual), Pn (120 minutos tras la toracotomía); PRp (120 minutos tras Pn); Rp-10' (10 minutos tras PRp); y Rp-30' (30 minutos tras PRp).

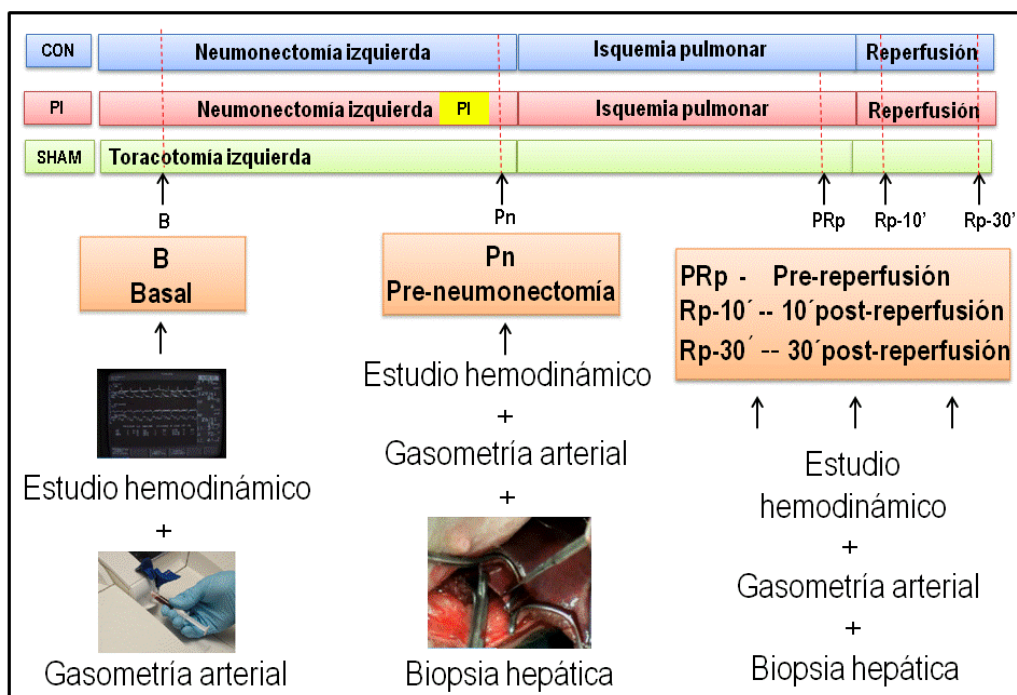


Fig. 25: Esquema momentos de medición y toma de muestras

3.3.6 VARIABLES HEMODINÁMICAS

Las variables hemodinámicas analizadas en el estudio son la presión arterial media (PAM), el índice cardiaco (IC) y la frecuencia cardiaca (FC).

El catéter alojado en la arteria femoral permite medir la presión arterial media (PAM). Mediante el monitor de gasto cardiaco (Edwards Lifesciences) y utilizando el método de termodilución, se analiza el índice cardiaco (IC). El método de termodilución se basa en la premisa, de que al añadir a la sangre circulante un líquido con una temperatura diferente a la de la misma sangre, la tasa de flujo sanguíneo será inversamente proporcional al cambio de concentración de ese líquido inyectado a lo largo del tiempo. La forma en que dicho principio se aplica al experimento es inyectando diez mililitros de un líquido (suero salino fisiológico) con una temperatura diferente a la de la sangre (a 0°C) a través de la luz proximal del catéter venoso central. Finalmente la frecuencia cardiaca se registra de forma continua gracias a la monitorización electrocardiográfica

3.3.7 VARIABLES GASOMÉTRICAS

Las muestras de sangre arterial obtenidas en los diferentes momentos del experimento fueron analizadas obteniendo los valores de la presión arterial de oxígeno (PaO₂), de la presión arterial de dióxido de carbono (PaCO₂) y del pH sanguíneo.

3.3.8 VARIABLES BIOQUÍMICAS EN EL TEJIDO HEPÁTICO

Durante el experimento se tomaron cuatro biopsias del tejido hepático para llevar a cabo los estudios bioquímicos. Los cuatro momentos de las biopsias hepáticas fueron: pre-neumonectomía (Pn), pre-reperfusión (PRp), 10 y 30 minutos tras la perfusión (Rp-10' y Rp-30').

Cada una de las muestras hepáticas fue introducida en un criotubo procediendo a su inmediata congelación en nitrógeno líquido. Las muestras son almacenadas en un congelador que las mantiene a una temperatura de – 80°C hasta su posterior análisis bioquímico.

Para la determinación del daño hepático se realizó el análisis de los siguientes mediadores:

- **La expresión proteica del TNF α , de la IL-1 e IL-10 y de la iNOS se obtuvo mediante el análisis Western Blot**

Las muestras hepáticas, con un peso aproximado de 50-60 mg, se homogeneizaron en tampón de lisis (cociente 20:250) y fueron sonicadas. Posteriormente las muestras se hirvieron con tampón de carga de gel [0,100 M Tris-Cl; 4% SDS (dodecilsulfato sódico); 20% glicerol; 0,1% azul de bromofenol] (ratio 1:1). Para corregir posibles variaciones en el tamaño de las muestras se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (187).

Se empleó la electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (10%) para separar el total de proteínas equivalentes (30 mg) de cada una de las muestras, siendo posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) mediante un sistema de transferencia semi seco.

La membrana fue inmediatamente colocada en un tampón de bloqueo (5% de leche desnatada; 20 mM Tris; pH 7,5; 150 mM NaCl; y 0,01% Tween-20), e incubada durante una hora a 37°C.

A continuación, la membrana fue incubada en presencia de anticuerpos policlonales específicos de conejo [TNF α (1:400; Bio Genesis), IL-1 β (1:4000; Bio Genesis), IL-10 (1:4000; Bio Genesis), e iNOS (1:1000; Bio Genesis) durante una noche a 4°C. Posteriormente las membranas se incubaron de nuevo en presencia de un anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulinas de conejo, acoplado covalentemente a una peroxidasa (1:2000) (horseradish peroxidase-conjugated polyclonal anti-rabbit IgG secondary antibody, Transduction Lab, Lexington, KY).

Después de lavar con T-TBS las membranas fueron incubadas con reactantes de detección ECL Plus (Amersham Life Science Inc., Buckinghamshire, UK) y expuestas a una película de rayos X.

Las películas fueron escaneadas con un densitómetro (BioRad GS 800) para determinar sus densidades ópticas relativas. Usamos marcadores proteicos marcados previamente para las determinaciones del peso molecular. La reproducibilidad dentro de los ensayos se evaluó con tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó con tres replicados. El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor de 5%. El coeficiente de variación inter-ensayo fue menor de 6%

- **La expresión del mRNA del TNF α , de la IL-1 e IL-10, de la iNOS, del MCP-1 y del NF κ B se obtuvo mediante el aislamiento del ARN y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)**

Para el aislamiento del ARN de las muestras hepáticas porcinas, fue utilizado siguiendo el protocolo de los productores, el kit TRI reactivo (Molecular Research Centre, Inc, Cincinnati, OH, USA) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (188). La pureza del ARN se midió con electroforesis en gel 1,5% agarosa, y las concentraciones de ARN fueron determinadas con espectrofotometría (260nm).

El sistema de transcripción inversa (Promega, Madison, WI, USA) y un hexámero pd(N)₆ aleatorio fueron utilizados para realizar la transcripción inversa de 2 μ g de ARN para la síntesis de cADN.

La RT-PCR se realizó usando un aparato Applied Biosystems 7300 con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), y con concentraciones de 300nm de cebadores específicos. La amplificación RT-PCR fue realizada de la siguiente forma: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15s, 60°C durante 1 minuto, 95° C durante 15s, 60°C durante 30s y 95° durante 15s.

Para la normalización de la carga del cADN en PCR, se utilizó la amplificación del 18S rARN por cada muestra. Los cambios relativos en la expresión genética fueron calculados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (189).

Tabla 1: Cebadores específicos usados para la RT-PCR

	Cebadores	Secuencia (5'–3')
18S	Delantero	GGTGCATGGCCGTTCTTA
	Reverso	TCGTTTCGTTATCGGAATTAACC
TNF- α	Delantero	ATGAGAAGTTCCCAAATGGC
	Reverso	CTCCACTTGGTGGTTTGCTA
IL-1 β	Delantero	TGTGATGAAAGACGGCACAC
	Reverso	CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
IL-10	Delantero	ACTGCACCCACTTCCCAGT
	Reverso	TTGTCCAGCTGGTCCTTTGT
iNOS	Delantero	CTTTGCCACGGACGAGAC
	Reverso	TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC
MCP-1	Delantero	AGCATCCACGTGCTGTCTC
	Reverso	GATCATCTTGCCAGTGAATGAGT
NFkB1	Delantero	CAGCTCTTCTCAAAGCAGCA
	Reverso	TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA

- El estudio de la apoptosis se realizó mediante la determinación de caspasa-3 utilizando la técnica ELISA

Las muestras hepáticas congeladas fueron pesadas y transferidas a tubos de propileno de 50ml (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) que contenían tampón de

lisis (4°C) en un ratio de 10ml tampón/1 gr de tejido mojado. El tampón de lisis consistía en fenilmetilsulfonilfluoride 1mM (PMSF; Sigma Chemical Company), 1mg/ml pepsatin A (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), y leupeptina (Sigma Chemical Company) en una solución salina tampón 1X fosfato de pH 7.2 (Biofluids, Rockville, MD, USA) conteniendo 0.05% azida sódica (Sigma Chemical Company).

Las muestras fueron homogeneizadas durante 30 segundos con un homogeneizador eléctrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminister, NY) a velocidad máxima, y los tubos se congelaron en nitrógeno líquido. La homogeneización de las muestras se llevó a cabo en tres ocasiones para lograr un procesamiento óptimo. Posteriormente fueron incubadas en un baño maría a 37°C y centrifugadas a 119,000 x g (1h, 4°C) para separar las organelas celulares. El sobrenadante obtenido fue congelado a -80°C para permitir la formación de agregados macromoleculares. Tras proceder a su descongelación a 4°C, los agregados fueron centrifugados a 3000 g (4°C) y el homogeneizado final fue medido con una pipeta graduada. Finalmente, los homogeneizados se almacenaron a -80°C hasta el momento en que fueron analizados para detectar la presencia cuantitativa de citoquinas (Biosource) y caspasas (Sigma Chemical Company), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Usamos el kit ELISA (“Ensayo por Inmunoabsorción Ligada a Enzimas”), siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma Chemical Company), para medir los niveles de Caspasa-3 en los homogeneizados hepáticos recogidos de todos los grupos de cerdos.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis de los datos se utilizó el programa informático SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias significativas entre las medias de los diferentes grupos. Posteriormente, para determinar que medias eran significativamente

diferentes de otras, se utilizó el test de Mann-Whitney. Se consideró como estadísticamente significativo un valor P menor 0,05 con un nivel del 95% de confianza.

4. RESULTADOS

4.1 VARIABLES GENERALES

En el análisis de las variables generales no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control (CON), preconditionamiento isquémico (PI), y simulado (SHAM) respecto al peso de los animales o duración del procedimiento quirúrgico (Tabla 2).

Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los grupos CON y PI en relación al tiempo de isquemia pulmonar (Tabla 2).

Tabla 2: Variables demográficas y tiempos quirúrgicos

VARIABLE	GRUPO	VALOR	P
PESO (K)	CON	47 (11)	> 0,05
	PI	38 (14)	
	SHAM	40 (11)	
TIEMPO TOTAL DE LA INTERVENCIÓN (minutos)	CON	287 (35)	> 0,05
	PI	308 (38)	
	SHAM	291 (10)	
TIEMPO DE ISQUEMIA (minutos)	CON	100 (17)	> 0,05
	PI	108 (10)	

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

4.2 VARIABLES HEMODINÁMICAS

- **Presión arterial media (PAM)**

Los valores de presión arterial media muestran gran estabilidad durante las distintas fases del procedimiento. El análisis estadístico no revela diferencias significativas entre los grupos CON, PI y SHAM. En las comparaciones intragrupos tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3, Fig. 26).

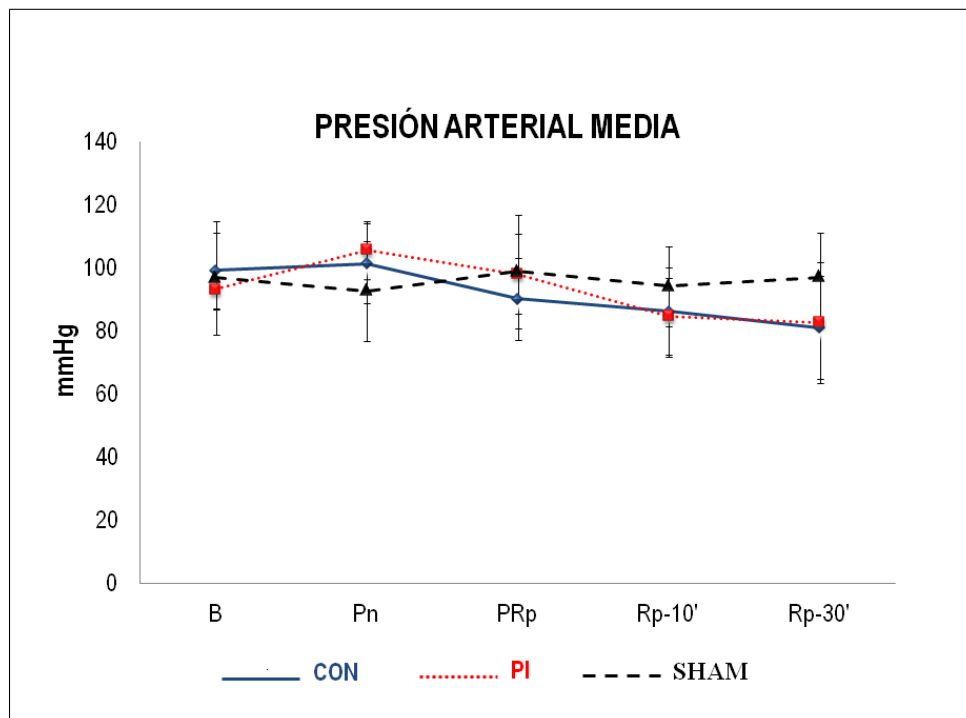


Fig. 26: Evolución de la presión arterial media (PAM). B: basal. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

- **Frecuencia cardiaca (FC)**

La frecuencia cardiaca se mantiene también estable a lo largo del procedimiento, no observándose diferencias significativas en los valores de cada uno de los grupos, ni entre grupos (Tabla 3, Fig. 27).

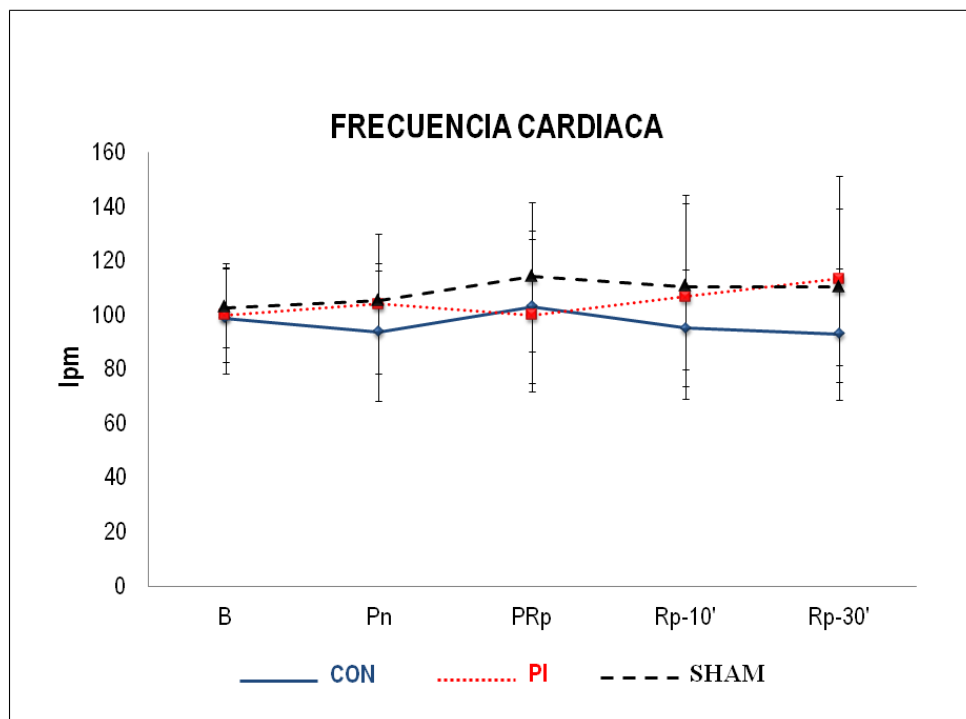


Fig. 27: Evolución de la frecuencia cardiaca (FC). B: basal. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

- **Índice Cardíaco**

Respecto al índice cardíaco, el análisis estadístico no pone de manifiesto diferencias significativas intragrupos. No obstante, al comparar los grupos entre sí, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CON y SHAM en los momentos PRp ($P = 0,042$) y Rp-10' ($P = 0,049$) (Tabla 3, Fig. 28).

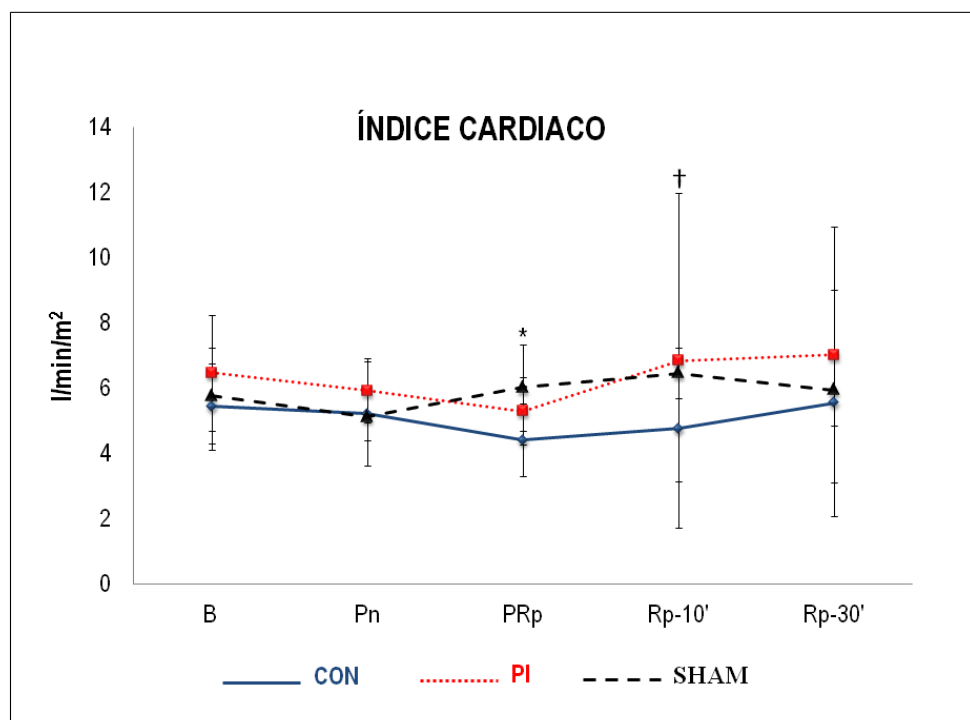


Fig. 28: Evolución del Índice Cardíaco (IC). B: basal. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. * $P = 0,042$ entre los grupos CON y SHAM. † $P = 0,049$ entre los grupos CON y SHAM.

Tabla 3: Variables hemodinámicas

VARIABLE	GRUPO	B	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
PAM (mmHg)	CON	99 (4)	101 (4)	90 (4)	86 (4)	81 (5)
	PI	93 (2)	106 (3)	98 (4)	85 (4)	83 (6)
	SHAM	97 (8)	93 (7)	99 (8)	94 (6)	97 (6)
FC (latidos/min)	CON	99 (6)	94 (8)	103 (9)	95 (7)	93 (8)
	PI	100 (6)	104 (9)	100 (10)	107 (13)	113 (13)
	SHAM	103 (6)	105 (5)	114 (12)	111 (14)	110 (13)
IC	CON	5,4 (0,4)	5,2 (0,5)	4,4 (0,4) *	4,8 (0,5) †	5,5 (1,1)
	PI	6,5 (0,6)	5,9 (0,3)	5,3 (0,4)	6,8 (1,8)	7 (1,4)
	SHAM	5,8 (0,6)	5,1 (0,3)	6 (0,6)	6,5 (0,3)	5,9 (0,6)

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). PAM: presión arterial media. FC: frecuencia cardiaca. IC: índice cardiaco. B: basal. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. * P = 0,042 entre los grupos CON y SHAM. † P = 0,049 entre los grupos CON y SHAM.

4.3 VARIABLES GASOMÉTRICAS

- **Presión arterial de oxígeno (PaO₂)**

Los valores de PaO₂ en sangre arterial periférica sufren discretas variaciones a lo largo del procedimiento no observándose diferencias significativas intragrupos (Tabla 4, Fig. 29).

Al comparar los valores de PaO₂ en los distintos grupos se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,019$) a los 10 minutos post-reperfusión (Rp-10') entre los grupos CON y SHAM (Tabla 4, Fig. 29).

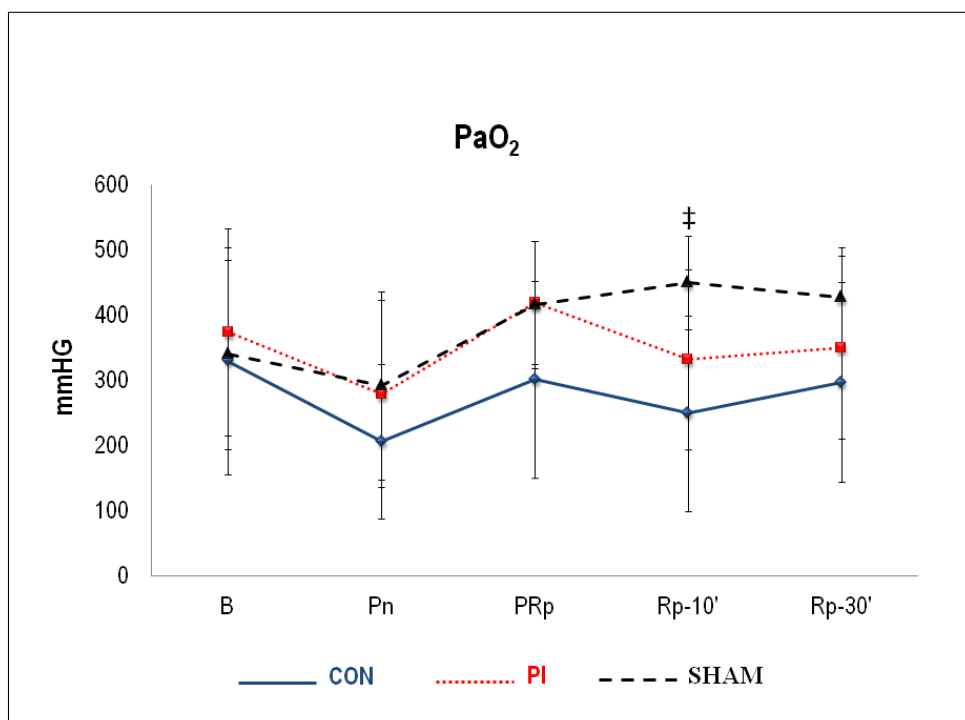


Fig. 29. Evolución de la PaO₂. B: basal. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperfusión. Rp-10': 10 minutos post-reperfusión. Rp-30': 30 minutos post-reperfusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. ‡ $P = 0,019$ entre los grupo CON y SHAM.

- **Presión arterial de dióxido de carbono (PaCO₂)**

La medición de la PaCO₂ en sangre arterial periférica muestra gran estabilidad en los diferentes momentos del procedimiento. No se encontraron diferencias significativas en los valores intragrupos ni al comparar los diferentes grupos entre sí (Tabla 4, Fig. 30).

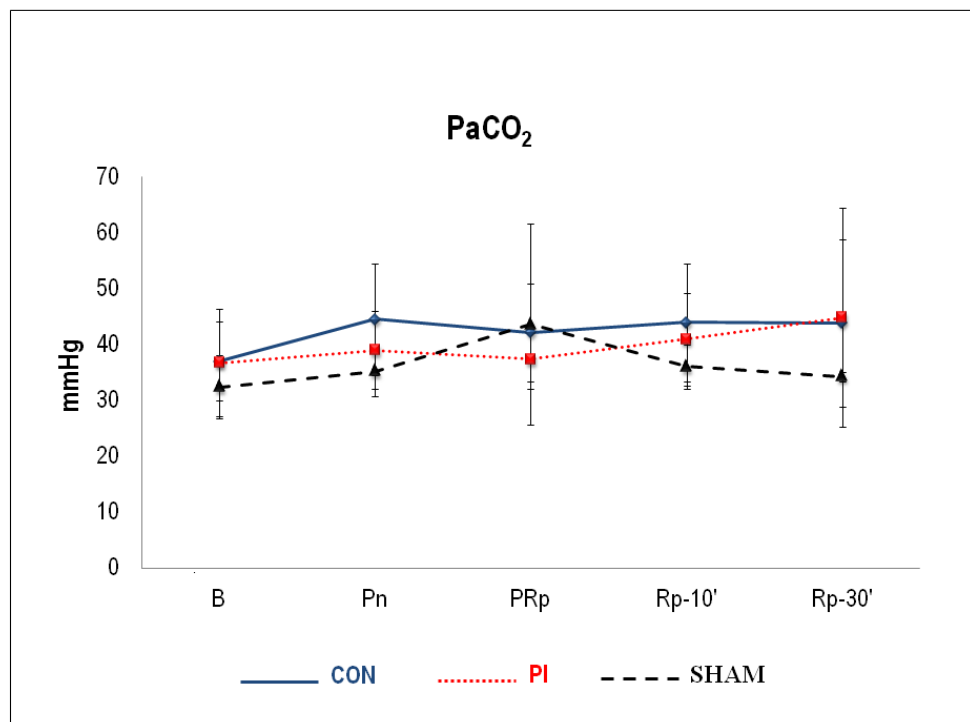


Fig. 30: Evolución de la PaCO₂. B: basal. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

- **pH sistémico**

El pH sistémico muestra discretas variaciones no significativas en los valores intragrupos. A pesar de ello el valor del pH sistémico se encuentra en rango fisiológico a lo largo de todo el procedimiento (Tabla 4, Fig. 31).

Al analizar y comparar los grupos entre sí tampoco se registraron diferencias significativas (Tabla 4, Fig. 31).

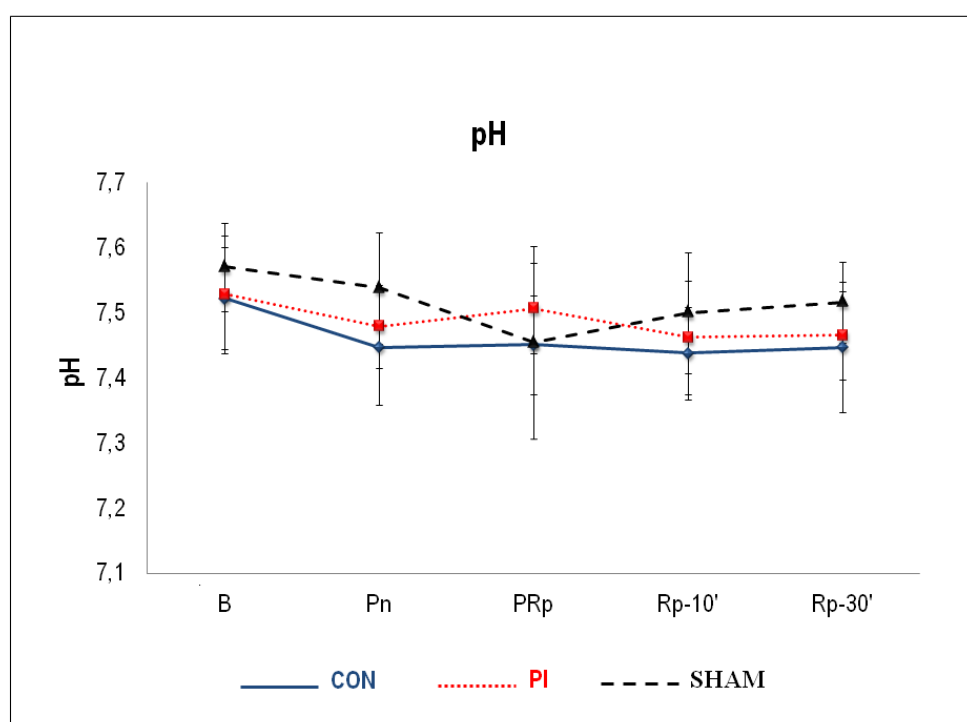


Fig. 31: Evolución del pH sistémico. B: basal. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

Tabla 4: Variables gasométricas

VARIABLE	GRUPO	B	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
PaO ₂	CON	330 (55)	207 (37)	302 (48)	250 (47) ‡	297 (49)
	PI	375 (50)	280 (45)	420 (31)	332 (44)	351 (44)
	SHAM	340 (64)	293 (65)	417 (44)	451 (32)	428 (34)
PaCO ₂	CON	37 (2)	44 (3)	42 (3)	44 (3)	44 (5)
	PI	37 (3)	39 (2)	37 (2)	41 (3)	45 (6)
	SHAM	32 (2)	35 (2)	44 (8)	36 (2)	34 (1)
pH	CON	7,52 ± 0,02	7,44 ± 0,02	7,45 ± 0,02	7,44 ± 0,02	7,45 ± 0,03
	PI	7,53 ± 0,02	7,47 ± 0,02	7,50 ± 0,02	7,46 ± 0,03	7,46 ± 0,02
	SHAM	7,57 ± 0,03	7,53 ± 0,04	7,45 ± 0,07	7,50 ± 0,04	7,51 ± 0,03

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). PaO₂: presión arterial de oxígeno. PaCO₂: presión arterial de dióxido de carbono. pH: pH sistémico. B: basal. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. ‡ P = 0,019 entre los grupos CON y SHAM.

4.4 VARIABLES BIOQUÍMICAS

4.4.1 CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

- **Análisis Western Blot del factor de necrosis tumoral alpha (TNF α)**

La isquemia-reperfusión pulmonar indujo un aumento en la expresión de la citoquina proinflamatoria TNF α en el hígado de los animales del grupo CON en los momentos PRp, Rp-10' y Rp-30' ($P = 0,0051$) en comparación con los valores Pn. Un incremento similar fue observado en el grupo PI en los mismos momentos ($P = 0,0069$, PRp frente a Pn; $P = 0,0051$, Rp-10' frente a Pn; $P = 0,037$, Rp-30' frente a Pn). Por el contrario, en el grupo SHAM la expresión del TNF α se mantuvo estable a lo largo del procedimiento (Tabla 5, Fig. 32).

En el análisis intergrupos se observó que el incremento en la expresión hepática del TNF α fue mayor en el grupo CON con respecto al grupo PI en los momentos PRp, Rp-10' y Rp-30' ($P = 0,0029$, $P = 0,0015$ y $P = 0,0011$, respectivamente). Al comparar el grupo SHAM con los grupos CON y PI se observaron diferencias significativas en el momento previo a la perfusión y tras el restablecimiento del flujo sanguíneo (Tabla 5, Fig. 32).

- **Expresión del mARN del factor de necrosis tumoral alpha (mARN TNF α)**

Al estudiar las variaciones en la expresión de mARN del TNF α a lo largo del procedimiento se observó un incremento en su expresión en el grupo CON en el momento PRp respecto al momento pre-neumonectomía (Pn) ($P = 0,0093$). Pasados 10 minutos del inicio de la perfusión, la expresión de mARN del TNF α se redujo de forma significativa respecto al valor PRp ($P = 0,049$). En los grupos PI y SHAM no se registraron diferencias significativas (Tabla 5, Fig. 33).

Al comparar los tres grupos entre sí, se presenció que la expresión hepática de mRNA del TNF α fue menor en el momento PRp en el grupo PI respecto al grupo CON ($P = 0,047$) (Tabla 5, Fig. 33).

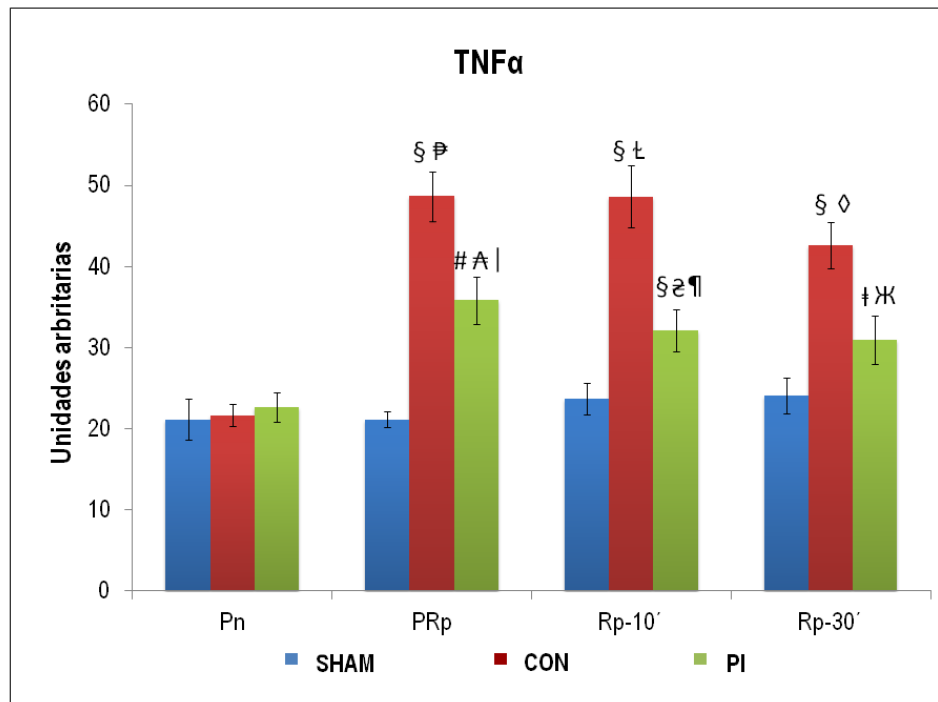


Fig. 32: Expresión hepática del factor de necrosis tumoral α (TNF α). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos: § $P = 0,0051$ frente a Pn; # $P = 0,0069$, PRp frente a Pn; † $P = 0,037$ Rp-30' frente a Pn. Análisis intergrupos: ¤ $P = 0,0029$, entre los grupos CON y PI; ¤ $P = 0,0015$, entre los grupos CON y PI; ¤ $P = 0,0011$, entre los grupos CON y PI; ¤ $P = 0,00066$, entre los grupos CON y SHAM; ¤ $P = 0,0013$, entre los grupos CON y SHAM; ¤ $P = 0,0027$, entre los grupos CON y SHAM; | $P = 0,0047$, entre los grupos PI y SHAM; ¶ $P = 0,04$, entre los grupos PI y SHAM.

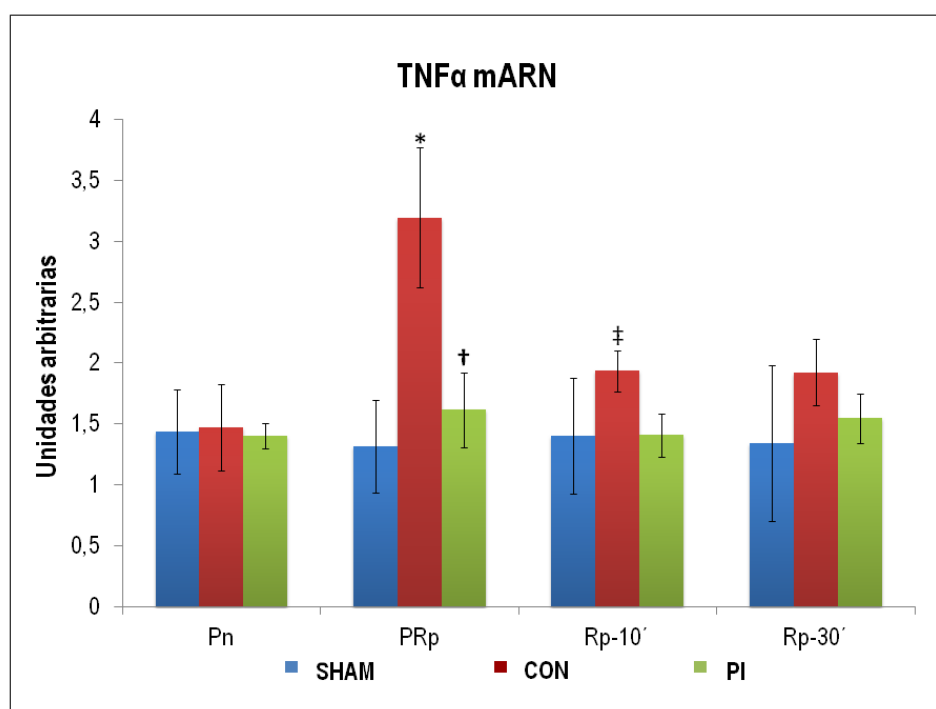


Fig. 33: Expresión hepática de mARN del factor de necrosis tumoral α (mARN TNF α). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperfusión. Rp-10': 10 minutos post-reperfusión. Rp-30': 30 minutos post-reperfusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos: * $P = 0,0093$ PRp frente a Pn; ‡ $P = 0,049$ Rp-10' frente a PRp. Análisis intergrupos: † $P = 0,047$ entre los grupos PI y CON.

Tabla 5: Variables bioquímicas. Citoquinas proinflamatorias. Factor de necrosis tumoral alpha

VARIABLE	GRUPO	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
TNF α	CON	21,7 (1,36)	48,9 (3,05) § P	48,6 (3,78) § L	42,6 (2,87) § ◇
	PI	22,7 (1,82)	35,8 (2,89) # A 	32,1 (2,59) § z ¶	30,9 (3,03) † K
	SHAM	21,2 (2,51)	21,2 (0,94)	23,7 (1,95)	24,1 (2,21)
TNF α mARN	CON	1,47 (0,36)	3,19 (0,57) *	1,93 (0,17) ‡	1,93 (0,27)
	PI	1,41 (0,11)	1,62 (0,31) †	1,41 (0,18)	1,55 (0,21)
	SHAM	1,44 (0,35)	1,31 (0,38)	1,41 (0,47)	1,34 (0,64)

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). TNF α : factor de necrosis tumoral α . TNF α mARN: mARN del factor de necrosis tumoral α . Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos TNF α : § P = 0,0051 frente a Pn; # P = 0,0069, PRp frente a Pn; † P = 0,037 Rp-30' frente a Pn. Análisis intergrupos TNF α : A P = 0,0029, entre los grupos CON y PI; z P = 0,0015, entre los grupos CON y PI; K P = 0,0011, entre los grupos CON y PI; P P = 0,00066, entre los grupos CON y SHAM; L P = 0,0013, entre los grupos CON y SHAM; ◇ P = 0,0027, entre los grupos CON y SHAM; | P = 0,0047, entre los grupos PI y SHAM; ¶ P = 0,04, entre los grupos PI y SHAM. Análisis intragrupos TNF α mARN: * P = 0,0093 frente a Pn; ‡ P = 0,049 frente a PRp. Análisis intergrupos TNF α mARN: † P = 0,047 entre los grupos CON y PI.

- **Análisis Western Blot de la Interleuquina 1 (IL-1)**

En el grupo CON, la expresión hepática de la IL-1 fue mayor en los momentos PRp ($P = 0,0069$), Rp-10' y Rp-30' ($P = 0,0051$) en comparación con los valores Pn. A su vez, el valor de la expresión de IL-1 fue superior también en el momento Rp-10' respecto al PRp ($P = 0,0051$) y en el momento Rp-30' respecto al Rp-10' ($0,0051$). En los grupos PI y SHAM, la expresión de la IL-1 se mantuvo estable a lo largo del procedimiento sin registrar diferencias significativas (Tabla 6, Fig. 34).

En el análisis intergrupos, se observó que la expresión de IL-1 fue menor en los grupos PI y SHAM en comparación con el grupo CON. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos PI y CON en los momentos PRp ($P = 0,0039$), Rp-10' y Rp-30' ($P = 0,0001$), momentos en los que también se objetivaron diferencias entre los grupos CON y SHAM ($P = 0,0047$, $P = 0,0013$ y $P = 0,00066$, respectivamente) (Tabla 6, Fig. 34).

- **Expresión del mARN de la Interleuquina-1 (mARN IL-1)**

La expresión tisular hepática del mARN de la IL-1 aumenta progresivamente hasta alcanzar su valor máximo tras 10 minutos de reperusión en el grupo CON ($P = 0,0069$, Rp-10' vs PRp; $P = 0,0051$, Rp-10' frente a Pn) y en el grupo PI ($P = 0,046$, Rp-10' frente a PRp; $P = 0,028$, Rp-10' frente a Pn). En el grupo SHAM la expresión del mARN de la IL-1 se mantiene estable a lo largo de todo el procedimiento (Tabla 6, Fig. 35).

Al comparar la expresión del mARN de la IL-1 entre los grupos CON y PI se observó que en el grupo PI su expresión fue menor respecto al grupo CON a los 30 minutos post-reperusión ($P = 0,00025$) (Tabla 6, Fig. 35).

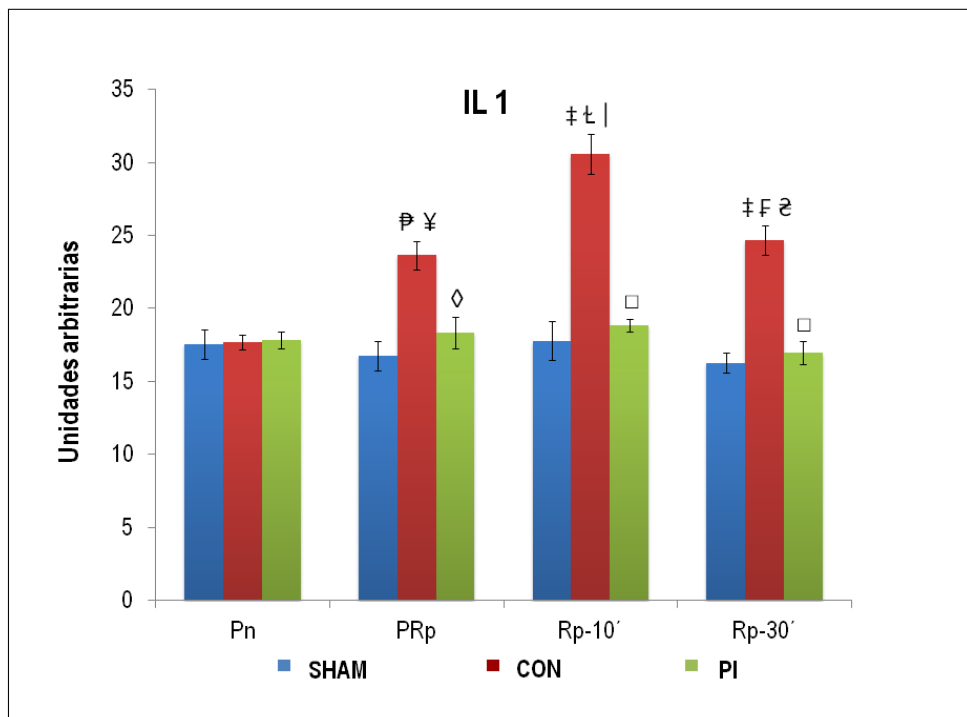


Fig. 34: Expresión hepática de la Interleuquina 1 (IL-1). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulados. Análisis intragrupos: ₧ P = 0,0069, PRp frente a Pn; ‡ P = 0,0051, Rp-10' y Rp-30' frente a Pn; £ P = 0,0051, Rp-10' frente a PRp; ₣ P = 0,0051, Rp-30' frente a Re-10'. Análisis intergrupos: ◇ P = 0,0039, entre el grupo CON y el PI; ¥ P = 0,0047, entre el grupo CON y el SHAM; □ P = 0,0001, entre el grupo CON y el PI; | P = 0,0013, entre el grupo CON y el SHAM; ₨ P = 0,00066, entre el grupo CON y el SHAM.

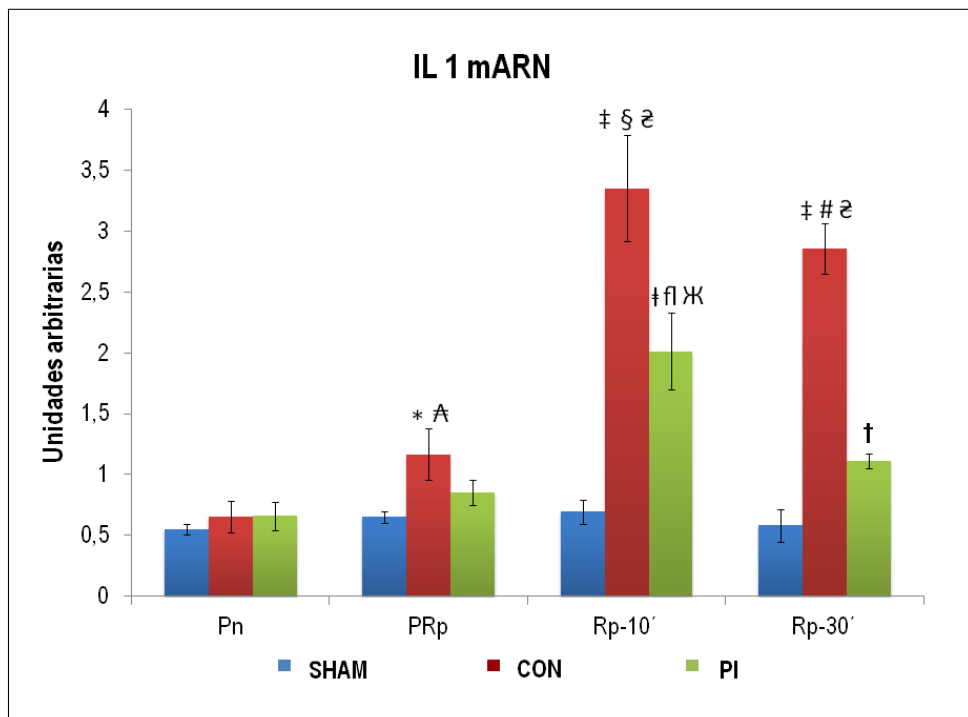


Fig. 35: Expresión hepática del mARN de la Interleuquina-1 (mARN IL-1). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperfusión. Rp-10': 10 minutos post-reperfusión. Rp-30': 30 minutos post-reperfusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos: * $P = 0,049$, PRp frente a Pn; ‡ $P = 0,0051$, Rp-10' y Rp-30' frente a Pn; § $P = 0,0069$, Rp-10' frente a PRp; # $P = 0,013$ Rp-30' frente a PRp; † $P = 0,028$ Rp-10' frente a Pn; † $P = 0,046$ Rp-10' frente a PRp. Análisis intergrupos: † $P = 0,00025$, entre los grupos CON y PI; A $P = 0,028$, entre los grupos CON y SHAM; ¤ $P = 0,00066$, entre los grupos CON y SHAM; X $P = 0,0303$, entre los grupos PI y SHAM.

Tabla 6: Variables bioquímicas. Citoquinas proinflamatorias. Interleuquina 1

VARIABLE	GRUPO	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
IL 1	CON	17,7 (0,51)	23,6 (0,99) ₪	30,6 (1,36) ‡ Ł	24,7 (0,99) ‡ F
	PI	17,8 (0,59)	18,4 (1,08) ◇	18,9 (0,42) □	16,9 (0,77) □
	SHAM	17,5 (1,02)	16,8 (1,02)	17,8 (1,36)	16,3 (0,68)
IL 1 mARN	CON	0,65 (0,13)	1,17 (0,21) * A	3,35 (0,44) ‡ §	2,86 (0,21) ‡ #
	PI	0,66 (0,12)	0,85 (0,10)	2,01 (0,32) ‡ fl	1,11 (0,06) †
	SHAM	0,55 (0,04)	0,65 (0,04)	0,69 (0,10)	0,58 (0,14)

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). IL-1: interleuquina-1. IL-1 mARN: mARN de la interleuquina-1. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos IL-1: ₪ P = 0,0069, PRp frente a Pn; ‡ P = 0,0051, Rp-10' y Rp-30' frente a Pn; Ł P = 0,0051, Rp-10' frente a PRp; F P = 0,0051, Rp-30' frente a Re-10'. Análisis intergrupos IL-1: ◇ P = 0,0039, entre los grupos CON y PI; ₪ P = 0,0047, entre los grupos CON y SHAM; □ P = 0,0001, entre los grupos CON y PI; | P = 0,0013, entre los grupos CON y SHAM; § P = 0,00066, entre los grupos CON y SHAM. Análisis intragrupos IL-1 mARN: * P = 0,049, PRp frente a Pn; ‡ P = 0,0051, Rp-10' y Rp-30' frente a Pn; § P = 0,0069, Rp-10' frente a PRp; # P = 0,013 Rp-30' frente a PRp; † P = 0,028 Rp-10' frente a Pn; fl P = 0,046, Rp-10' frente a PRp. Análisis intergrupos IL-1 mARN: † P = 0,00025, entre los grupos CON y PI; A P = 0,028, entre los grupos CON y SHAM; § P = 0,00066, entre los grupos CON y SHAM; Ж P = 0,0303, entre los grupos PI y SHAM.

4.4.2 PROTEÍNA QUIMIOTÁCTICA DE MONOCITOS 1 (MCP-1)

- **Expresión de mRNA de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)**

En el grupo CON el proceso de isquemia-reperfusión pulmonar se asoció con un aumento de la expresión del mRNA de la MCP-1 en el tejido hepático en los momentos PRp ($P = 0,037$), Rp-10' y Rp-30' ($P = 0,0051$) respecto al valor Pn. También resultó significativo el aumento de los valores Rp-10' y Rp-30' respecto a los valores PRp ($P = 0,028$, $P = 0,021$, respectivamente) Dicho incremento en la expresión de mRNA de la MCP-1 no se observó en los grupos PI y SHAM (Tabla 7, Fig. 36).

Al analizar y comparar los tres grupos entre sí, se registró que la expresión de mRNA de la MCP-1 fue significativamente mayor en el grupo CON respecto al grupo PI en los momentos Rp-10' y Rp-30' ($P = 0,00013$ y $P = 0,00008$ respectivamente). En los grupos CON y SHAM se objetivaron diferencias en los mismos momentos (Rp-10' y Rp-30', $P = 0,0027$) (Tabla 7, Fig. 36).

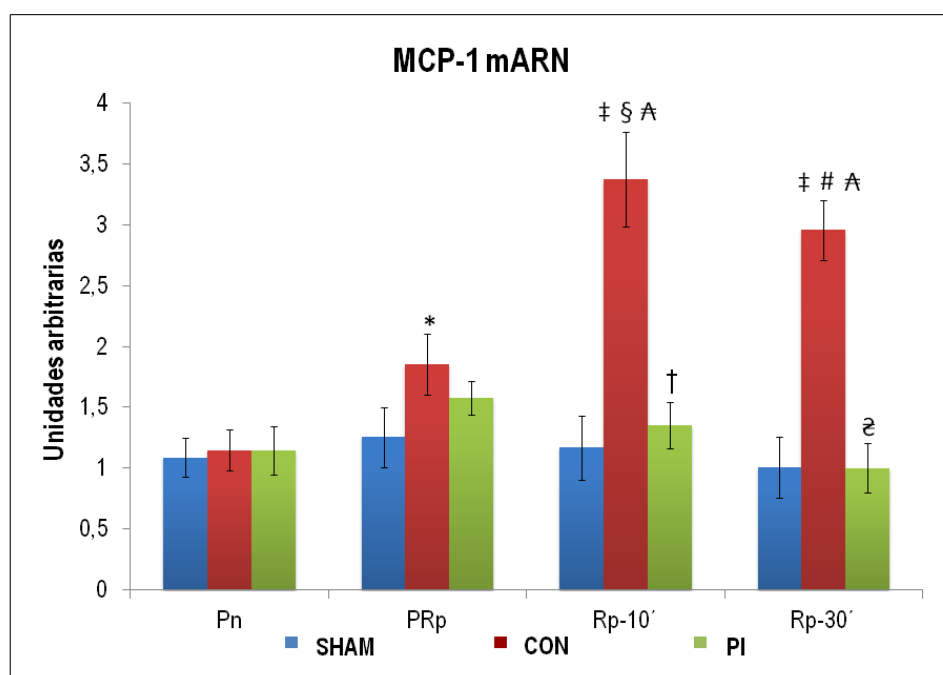


Fig. 36: Expresión del mRNA de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos: * $P = 0,037$, PRp frente a Pn; $‡ P = 0,0051$, Rp-10' y Rp-30' frente a Pn; $§ P = 0,028$, Rp-10' frente a PRp; $\# P = 0,021$, Rp-30' frente a PRp. Análisis intergrupos: $† P = 0,00013$, entre los grupos CON y PI; $A P = 0,0027$, entre los grupos CON y SHAM; $z P = 0,00008$, entre los grupos CON y PI.

Tabla 7: Variables bioquímicas. Proteína quimiotáctica de monocitos 1

VARIABLE	GRUPO	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
MCP 1 mARN	CON	1,15 (0,17)	1,85 (0,25) *	3,37 (0,39) ‡ § Å	2,96 (0,25) ‡ # Å
	PI	1,15 (0,19)	1,58 (0,14)	1,35 (0,19) †	1,01 (0,20) ¢
	SHAM	1,09 (0,16)	1,25 (0,25)	1,17 (0,26)	1,01 (0,25)

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). MCP-1 mARN: mARN de la proteína quimiotáctica de monocitos 1. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos MCP-1 mARN: * P = 0,037, PRp frente a Pn; ‡ P = 0,0051, Rp-10' y RP-30' frente a Pn; § P = 0,028, Rp-10' frente a PRp; # P = 0,021, Rp-30' frente a PRp. Análisis intergrupos MCP-1 mARN: † P = 0,00013, entre los grupos CON y PI; Å P = 0,0027, entre los grupos CON y SHAM; ¢ P = 0,00008, entre los grupos CON y PI.

4.4.3 CITOQUINA ANTIINFLAMATORIA INTELEUQUINA 10 (IL-10)

- **Análisis Western Blot de la Interleuquina 10 (IL-10)**

La expresión tisular hepática de la citoquina antiinflamatoria IL-10 se mantuvo estable a lo largo de todo el procedimiento en los tres grupos. No se registraron diferencias significativas ni en el análisis intragrupos, ni en el intergrupos (Tabla 8, Fig. 37).

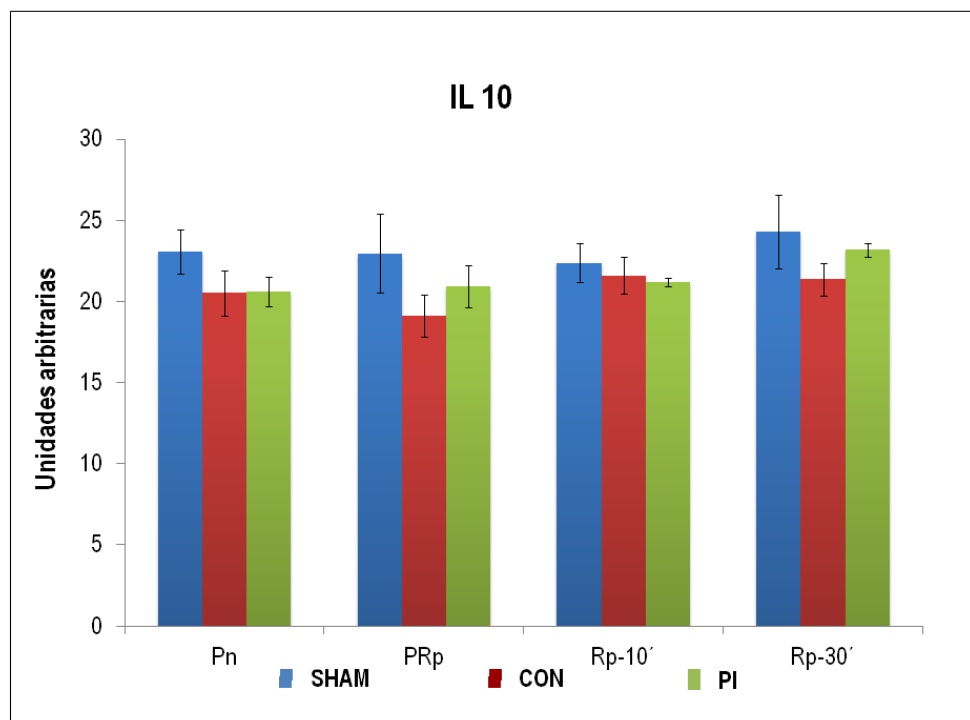


Fig. 37: Expresión hepática de la Interleuquina 10 (IL-10). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

- **Expresión del mRNA de la citoquina antiinflamatoria Interleuquina 10 (IL-10)**

Tras el restablecimiento del flujo sanguíneo pulmonar (Rp-10' y Rp-30') se observó que la expresión tisular hepática del mRNA de la IL-10 se redujo de forma significativa en el grupo CON en comparación con los valores Pn ($P = 0,047$ y $P = 0,0051$ respectivamente). En los grupos PI y SHAM no se registraron diferencias en la expresión del mRNA de la IL-10 (Tabla 8, Fig. 38).

Al realizar el análisis intergrupos, se observó que los valores de la expresión del mRNA de la IL-10 en los momentos Rp-10' y Rp-30' fueron menores en el grupo CON respecto al grupo PI ($P = 0,023$ y $P = 0,016$ respectivamente). Este hecho se repitió al comparar los grupos CON y SHAM ($P = 0,028$ y $P = 0,04$, respectivamente) (Tabla 8, Fig. 38).

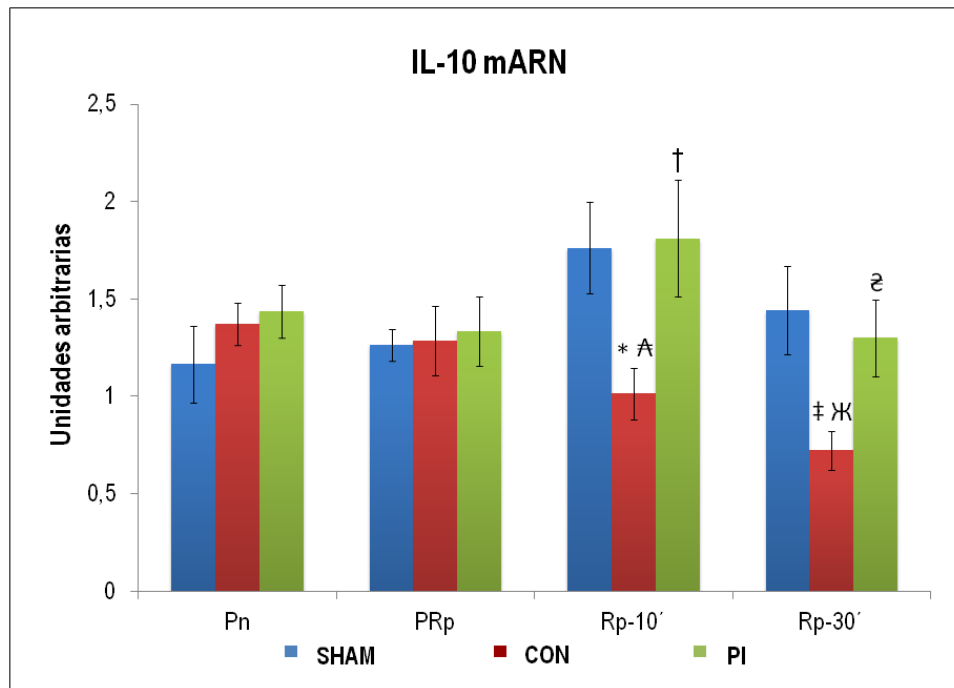


Fig. 38: Expresión hepática del mRNA de la interleuquina 10 (IL-10). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos: * $P = 0,047$, Rp-10' frente a Pn; ‡ $P = 0,0051$, Rp-30' frente a Pn. Análisis intergrupos: † $P = 0,023$, entre los grupos CON y PI; ‡ $P = 0,028$, entre los grupos CON y SHAM; ‡ $P = 0,016$, entre los grupos CON y PI; ‡ $P = 0,04$, entre los grupos CON y SHAM.

Tabla 8: Variables bioquímicas. Citoquina antiinflamatoria Interleuquina 10

VARIABLE	GRUPO	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
IL 10	CON	20,5 (1,42)	19,1 (1,31)	21,6 (1,14)	21,4 (1,01)
	PI	20,6 (0,90)	20,9 (1,29)	21,2 (0,27)	23,2 (0,43)
	SHAM	20,1 (1,37)	22,9 (2,43)	22,4 (1,21)	24,3 (2,26)
IL 10 mARN	CON	1,37 (0,11)	1,28 (0,18)	1,01 (0,13) * Δ	0,72 (0,10) \ddagger \mathcal{K}
	PI	1,44 (0,13)	1,33 (0,18)	1,81 (0,29) \dagger	1,30 (0,20) \mathcal{E}
	SHAM	1,16 (0,19)	1,26 (0,08)	1,76 (0,23)	1,44 (0,23)

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). IL-10: Interleuquina 10. IL-10 mARN: Interleuquina 10 mARN. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperfusión. Rp-10': 10 minutos post-reperfusión. Rp-30': 30 minutos post-reperfusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupo: * P = 0,047, Rp-10' frente a Pn; \ddagger P = 0,0051, Rp-30' frente a Pn. Análisis intergrupo: \dagger P = 0,023, entre los grupos CON y PI; Δ P = 0,028, entre los grupos CON y SHAM; \mathcal{E} P = 0,016, entre los grupos CON y PI; \mathcal{K} P = 0,04, entre los grupos CON y SHAM.

4.4.4 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR NFκB

- Expresión de mARN del factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB)

La expresión de mARN del NFκB presentó gran estabilidad a lo largo de todo el procedimiento en los grupos PI y SHAM. En el grupo CON se registró un aumento significativo en su expresión en el momento Rp-10' respecto al valor Pn ($P = 0,0069$) (Tabla 9, Fig. 39).

En las comparaciones entre los tres grupos no se registraron diferencias significativas (Tabla 9, Fig. 39).

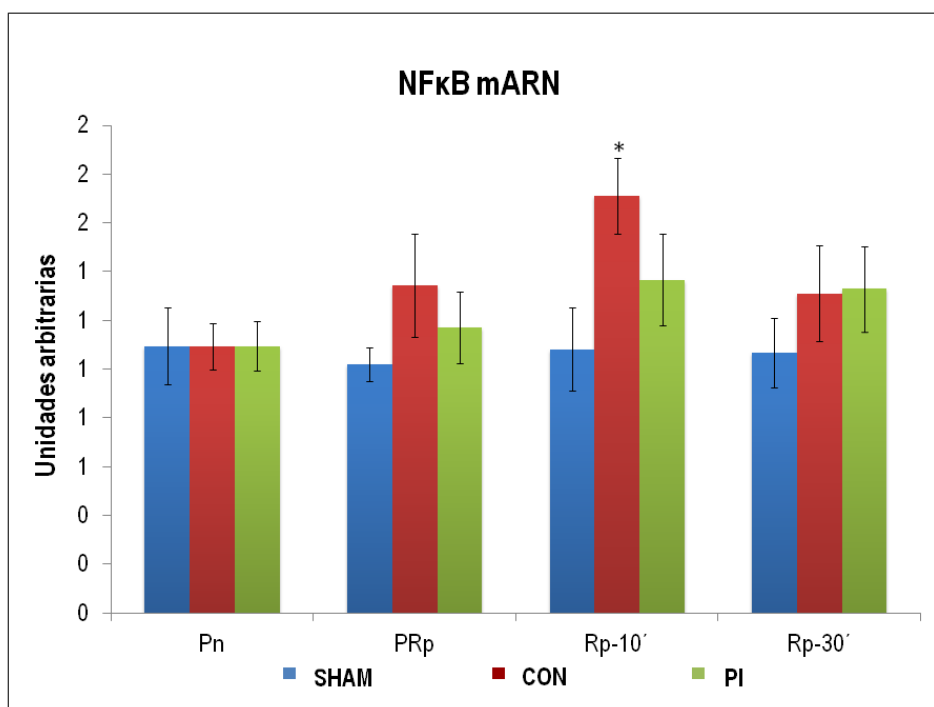


Fig. 39: Expresión hepática del mARN del factor de transcripción nuclear NFκB. Pn: pre-neumonecromía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupo: * $P = 0,0069$, Rp-10' frente a Pn.

Tabla 9: Variables bioquímicas. Factor de transcripción nuclear kappa B

VARIABLE	GRUPO	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
NκFβ mARN	CON	1,09 (0,09)	1,34 (0,21)*	1,71 (0,15)	1,31 (0,19)
	PI	1,09 (0,10)	1,17 (0,15)	1,37 (0,19)	1,33 (0,17)
	SHAM	1,09 (0,16)	1,02 (0,07)	1,08 (0,17)	1,07 (0,14)

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). NFκB mARN: mARN del factor de transcripción nuclear NFκB. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupo NFκB mARN: * P = 0,0069, Rp-10' frente a Pn.

4.4.5 METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO

- **Análisis Western Blot de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa y expresión del mRNA de la iNOS (mARN iNOS)**

Los valores de la iNOS y de la expresión del mRNA de la iNOS no sufren variaciones significativas a lo largo del procedimiento en ninguno de los tres grupos (Tabla 10, Figs. 40 y 41).

Al comparar los tres grupos entre sí, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10, Figs. 40 y 41).

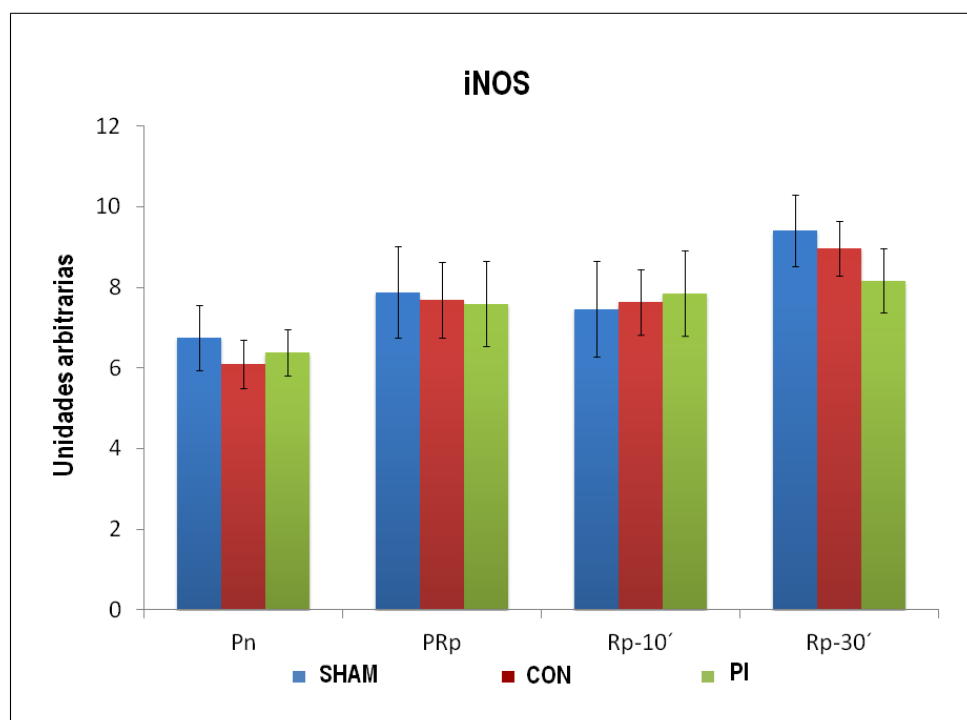


Fig. 40: Valor de la iNOS (isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

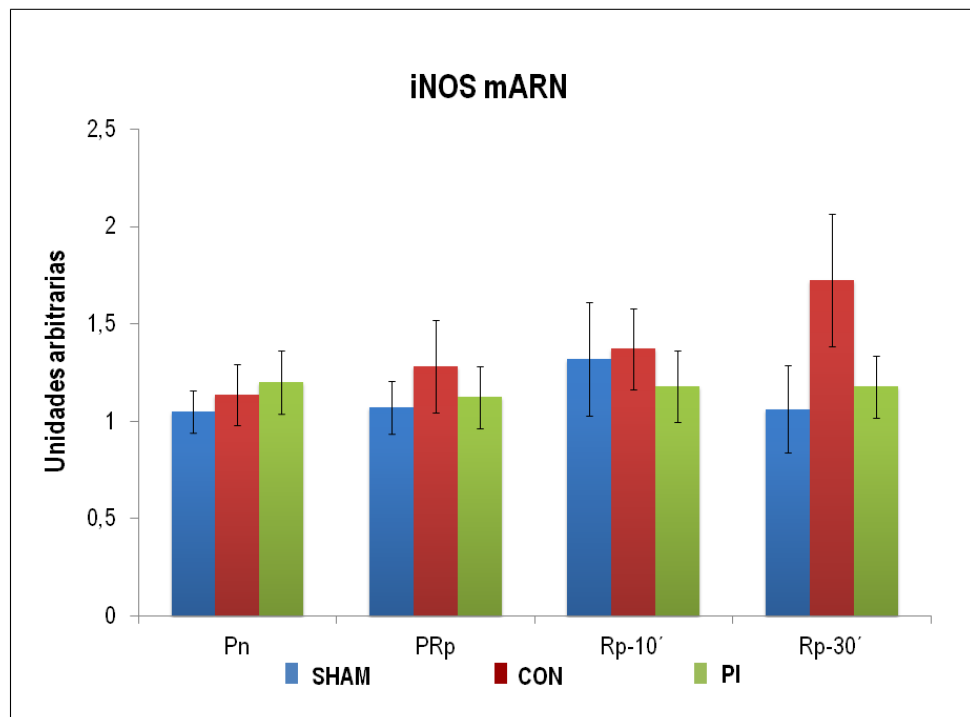


Fig. 41: Expresión del mARN de la iNOS (isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperfusión. Rp-10': 10 minutos post-reperfusión. Rp-30': 30 minutos post-reperfusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

Tabla 10: Variables bioquímicas. Isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa

VARIABLE	GRUPO	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
iNOS	CON	6,10 (0,60)	7,69 (0,93)	7,63 (0,81)	8,97 (0,68)
	PI	6,39 (0,57)	7,59 (1,05)	7,85 (1,06)	8,16 (0,79)
	SHAM	6,75 (0,81)	7,88 (1,13)	7,46 (1,19)	9,41 (0,88)
iNOS mARN	CON	1,14 (0,15)	1,28 (0,24)	1,37 (0,21)	1,72 (0,34)
	PI	1,19 (0,16)	1,12 (0,16)	1,18 (0,18)	1,18 (0,16)
	SHAM	1,05 (0,11)	1,07 (0,13)	1,32 (0,29)	1,06 (0,22)

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). iNOS: isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa. iNOS mARN: mARN de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.

4.4.6 APOPTOSIS

- **Cuantificación por ELISA de la Caspasa 3**

Los niveles proteicos de Caspasa 3 aumentaron de forma significativa en el grupo CON a medida que avanzaba el procedimiento: PRp, Rp-10' y Rp-30' vs Pn ($P = 0,043$), Rp-10' y Rp-30' vs PRp ($P = 0,043$) y Rp-30' vs Rp-10' ($P = 0,043$). En el grupo PI se registró un incremento en el momento Rp-30' en comparación con el momento Rp-10' ($P = 0,043$) (Tabla 11, Fig. 42).

En el análisis intergrupos se observó que el incremento en los niveles de Caspasa 3 fue mayor en el grupo PI respecto al grupo SHAM en el momento Rp-30' ($P = 0,016$). A su vez dicho incremento fue mayor en el grupo CON en comparación con el grupo PI en los momentos PRp, Rp-10' y Rp-30' ($P = 0,009$) (Tabla 11, Fig. 42).

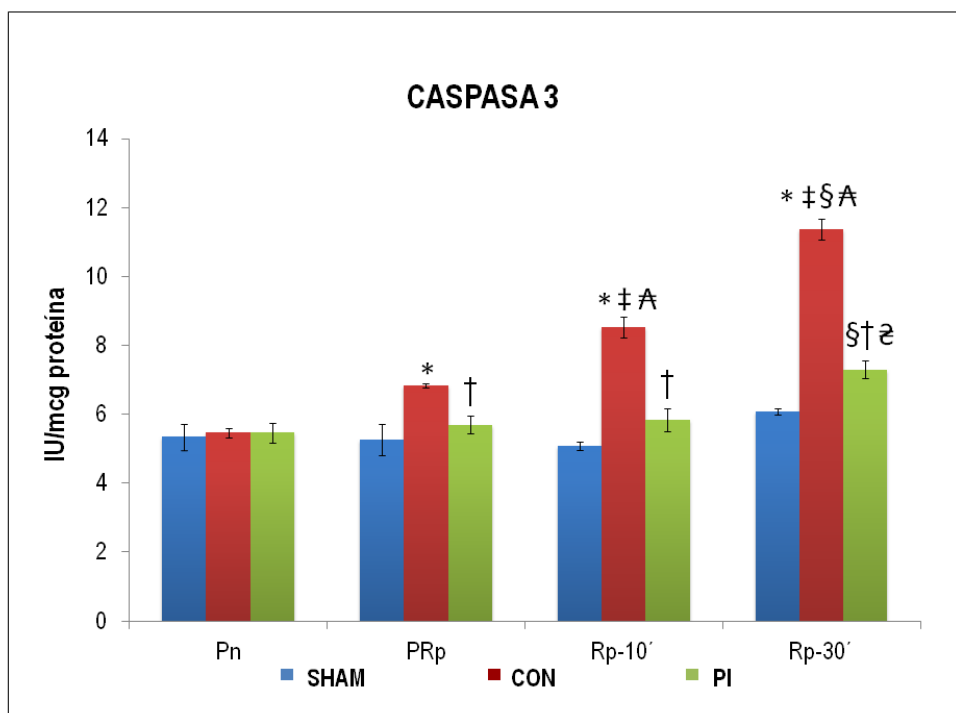


Fig. 42: Niveles proteicos de Caspasa 3. Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupos: * $P = 0,043$, PRp, Rp-10' y Rp-30' frente a Pn; † $P = 0,043$, Rp-10' y Rp-30' frente a PRp; ‡ $P = 0,043$, Rp-30' frente a Rp-10'. Análisis intergrupos: ‡ $P = 0,009$, entre los grupos CON y PI; A $P = 0,0079$, entre los grupos CON y SHAM; § $P = 0,016$, entre los grupos PI y SHAM.

Tabla 11: Variables bioquímicas. Caspasa 3

VARIABLE	GRUPO	Pn	PRp	Rp 10'	Rp 30'
Caspasa 3	CON	5,47 (0,13)	6,84 (0,06) *	8,53 (0,31) * ‡ A	11,4 (0,31) * ‡ § A
	PI	5,46 (0,29)	5,69 (0,25) †	5,84 (0,34) †	7,29 (0,22) § † e
	SHAM	5,35 (0,38)	5,26 (0,45)	5,09 (0,13)	6,07 (0,09)

Los resultados se expresan como media (desviación estándar: DE). Pn: pre-neumonectomía. PRp: pre-reperusión. Rp-10': 10 minutos post-reperusión. Rp-30': 30 minutos post-reperusión. CON: grupo control. PI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. Análisis intragrupo: * P = 0,043, PRp, Rp-10' y Rp-30' frente a Pn; ‡ P = 0,043, Rp-10' y Rp-30' frente a PRp; § P = 0,043, Rp-30' frente a Rp-10'. Análisis intergrupos: † P = 0,009, entre los grupos CON y PI; A P = 0,0079, entre los grupos CON y SHAM; e P = 0,016, entre los grupos PI y SHAM.

5. DISCUSIÓN

5.1 EFECTOS DEL SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR

Es ampliamente conocido que la privación del aporte sanguíneo a un órgano constituye un serio problema en diversos procedimientos médicos y quirúrgicos habituales tales como la terapia trombolítica, el trasplante de órganos y el *by-pass* cardiopulmonar (1).

Aunque el restablecimiento del flujo sanguíneo es esencial para la prevención del daño tisular irreversible, la reperfusión *per se* es capaz de perpetuar e incluso amplificar el daño orgánico inducido por el período de isquemia. Esta respuesta inflamatoria desencadenada por la reperfusión de tejidos isquémicos previamente viables constituye el conocido síndrome de isquemia-reperfusión (4).

El síndrome de IR además de inducir efectos adversos locales puede manifestarse como una afectación orgánica remota (5). De hecho, los efectos sistémicos pueden ser incluso más perjudiciales que sus efectos locales y son frecuentemente observados en el sistema renal, pulmonar, hepático y cardiovascular. La intensidad de la respuesta inflamatoria en el seno del proceso de IR puede ser de tal envergadura, que desencadene un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y un síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM). La aparición de estos síndromes constituye la principal causa de muerte en las unidades de pacientes críticos, estimándose que sean la causa del 30-40% de los fallecimientos en unidades terciarias de referencia de cuidados intensivos (5).

Actualmente, los cirujanos torácicos realizan procedimientos cada vez más complejos que envuelven procesos de IR pulmonar y cardíaca. El trasplante pulmonar, el trasplante lobar de donante vivo, la resección pulmonar en manguito con reconstrucción de la arteria pulmonar y la extirpación de tumores centrales pulmonares con posterior reimplantación del lóbulo o de los lóbulos remanentes son situaciones clínicas que conllevan procesos de IR pulmonar (177).

Tradicionalmente se pensaba que el sistema pulmonar era resistente a los efectos de la isquemia debido a su doble aporte sanguíneo (bronquial y pulmonar) y a su suministro

independiente de O_2 a través del espacio alveolar (74). No obstante, está ampliamente aceptado que la delicada membrana alveolo-capilar es una estructura extremadamente sensible al daño isquémico (75).

Los efectos locales de la IR pulmonar incluyen daño alveolar, edema pulmonar e hipoxemia. Además de los efectos locales comentados, la reperfusión del parénquima pulmonar isquémico se asocia al daño de órganos remotos (132) y al desarrollo de los síndromes previamente mencionados (SRIS y SDOM). La traducción clínica de estas alteraciones es la disfunción pulmonar y de órganos remotos, lo que aumenta significativamente la morbilidad postoperatoria.

La ventilación unipulmonar prolongada (> 1 hora), necesaria para la cirugía de resección pulmonar, debe ser considerada también como una potencial causa de complicaciones cardiovasculares a través de la producción de estrés oxidativo severo debido a la reexpansión pulmonar.

Muchos de los estudios centrados en la búsqueda de técnicas de protección del parénquima pulmonar a los efectos deletéreos de la IR están desarrollados en modelos clínicos y experimentales de trasplante pulmonar con isquemia fría (128). El problema radica en que en algunas de las situaciones clínicas descritas previamente y que asocian un síndrome de IR pulmonar no es posible el enfriamiento del órgano. De hecho, en dichas situaciones el pulmón sufre un tiempo variable de isquemia normotérmica, mientras el edema de reperfusión y la necesidad de ventilación postoperatoria son frecuentes (127). En este contexto, el estudio del daño pulmonar por IR requiere modelos experimentales en los que la isquemia sea iniciada sin frío ni preservación pulmonar. Por otra parte, la mayoría de los estudios de isquemia normotérmica están realizados en ratones mediante técnicas de oclusión vascular (21) y menos frecuentemente incluyen procesos quirúrgicos similares a los que se llevan a cabo en humanos.

Por lo tanto no existe ningún estudio experimental ideal para situaciones tales como la reconstrucción de la arteria pulmonar o trasplante lobar de donante vivo en los cuales el órgano es sometido de repente a isquemia normotérmica.

A pesar de que la IR puede afectar a múltiples órganos, el hígado parece ser especialmente vulnerable a los efectos deletéreos de la IR (190). El hígado juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis y de la función metabólica del organismo. Su participación en la detoxificación y filtrado de la sangre intestinal, y en la neutralización de toxinas y metabolismo de diversos fármacos resulta esencial.

Múltiples estudios experimentales de IR intestinal (190), renal (191, 192), de extremidades inferiores (52, 193) y de oclusión vascular (194) muestran un daño hepatocelular. De hecho, el hígado parece ser el primer órgano afectado por la IR intestinal, siendo las células de Kupffer hepáticas una de las vías más importantes implicadas en la fase temprana de la patogenia del daño hepático directo y remoto (195). La disfunción remota hepática en el seno del síndrome de IR constituye un factor pronóstico en pacientes ingresados en unidades de cuidados críticos elevando característicamente su morbilidad. De hecho, el daño orgánico remoto hepático secundario a la respuesta inflamatoria sistémica es reconocido como la causa simple más importante de muerte en las unidades de UCI (195).

Debido a la importancia del síndrome de IR pulmonar y de su repercusión clínica en el pronóstico y evolución de los pacientes sometidos a ciertas prácticas médicas y quirúrgicas habituales, establecemos un modelo experimental que nos permita una mejor comprensión de sus efectos. Además, el hecho de que el hígado sea un órgano especialmente vulnerable al daño remoto por la IR, nos motiva al estudio de las moléculas y vías de activación de la posible respuesta inflamatoria hepática secundaria. Por lo tanto, mediante la elección del procedimiento experimental de autotrasplante pulmonar en cerdos pretendemos poder estudiar los efectos remotos de la IR pulmonar en el hígado. Nuestro modelo experimental, al representar un modelo

de IR normotérmica en mamíferos de gran tamaño, tiene una gran similitud con procedimientos quirúrgicos torácicos como la angioplastia de la arteria pulmonar o el trasplante lobar de donante vivo y podría incluso tener cierta aplicabilidad clínica.

Retomando la línea argumental de que la IR pulmonar podría relacionarse con una disfunción hepática remota, encontramos diversos estudios que plantean dicha hipótesis. *Esme et al* (132) presentan un modelo de IR pulmonar en ratas, las cuales fueron sometidas a diferentes tiempos de isquemia (60 y 120 minutos) y posterior perfusión durante 60 minutos. En el modelo experimental de *Esme et al* la isquemia fue inducida mediante la oclusión del hilio pulmonar izquierdo con una pinza vascular no traumática. En dicho estudio se comprobó que un período de isquemia de 60 minutos seguido de 60 minutos de perfusión fue suficiente para aumentar significativamente la actividad mieloperoxidasa hepática, la cual representa un índice de reclutamiento de neutrófilos. La elevación de la actividad mieloperoxidasa hepática se acompañó de un incremento hepático de los marcadores de estrés oxidativo.

De forma similar en el presente modelo experimental se observó una respuesta inflamatoria remota en el hígado, la cual se caracterizó por un incremento en los niveles de la expresión proteica y del mRNA de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1. La expresión de los mediadores inflamatorios citados aumentó de forma significativa al final del período de isquemia y durante la fase inicial de la perfusión. Este hecho nos hace pensar que la expresión del TNF α y de la IL-1 constituye la etapa más precoz del daño remoto asociado al proceso de IR. Cabe destacar que la expresión del TNF α fue mayor al final de la isquemia y, aunque mantuvo niveles elevados durante la perfusión, estos fueron significativamente menores a los del momento PRp. Respecto a la expresión de la IL-1, observamos un aumento al final del período de isquemia manteniéndose elevada durante la perfusión. A tenor de nuestros resultados, podría afirmarse que el papel de la IL-1 y sobretodo del TNF α es esencial en el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica y podrían considerarse como iniciadores de la misma.

Además, al revisar la literatura podemos comprobar que diversos autores a través de sus diferentes estudios experimentales coinciden con nosotros en apuntar al TNF α e IL-1 como iniciadores o mediadores de la inflamación de fase temprana. *Yassin et al* (52) en un modelo experimental de IR de miembros inferiores en ratas observaron que las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 fueron los primeros mediadores inflamatorios en verse alterados y se relacionaron directamente con el desarrollo del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (52). En el estudio de *Yassin et al* también queda reflejado que el TNF α presenta una vida media corta, llegando a la conclusión de que presenta un período refractario que hace que al cabo de 1-2 horas sus niveles vuelven a adquirir los valores basales. Estos datos concuerdan con nuestro estudio en el cual el TNF α adquiere sus valores máximos al final del período de isquemia para luego disminuir durante la reperfusión. En el estudio de *Yassin et al* también se discute a cerca de la vía de producción de estos mediadores inflamatorios señalando a la vía de producción local y a las células de Kupffer (macrófagos residentes en el hígado) como principales protagonistas.

Paralelamente, en otro estudio de IR de miembros inferiores en ratas observamos similitudes con los resultados de *Yassin et al* y con los nuestros, al comprobar que la liberación de TNF α es una de las principales vías implicadas en la fase temprana de la patogenia del daño hepático directo y remoto (195). Los autores de este estudio demuestran que el inicio del daño hepático en respuesta a la IR de miembros inferiores consiste en una reducción de la perfusión microvascular hepática mediada por la liberación de TNF α (195). Los resultados observados son comprobados en otros modelos de IR, de hecho la IR renal también se asocia a un daño remoto hepático.

Varios estudios demuestran que tanto el daño renal isquémico (191, 196) como el no isquémico (191) inducen una alteración en el parénquima hepático. Los autores de estos estudios presentan resultados similares a los nuestros, al comprobar que la elevación de los

niveles de IL-1 y TNF α ocurre en las primeras etapas del daño renal. Además, al igual que Yassin *et al* predicen que las vías de producción de dichos mediadores son la vía local y las células de Kupffer (196). Estos resultados aportan más evidencia, si cabe, al papel que podría jugar el TNF α como director de orquesta del síndrome de IR al jugar un papel fundamental como iniciador y como inductor de la síntesis de otros mediadores inflamatorios (191).

Horie *et al* (69) también pretenden demostrar mediante un modelo de IR intestinal el protagonismo del TNF α y la IL-1 en el daño remoto hepático. Como se comenta previamente, el hígado parece ser el primer órgano afectado en el seno de la IR intestinal, relacionándose dicho daño con la generación de mediadores inflamatorios (TNF α e IL-1) en el intestino postisquémico y en el propio parénquima hepático.

Queda patente la similitud de nuestros resultados con los de diversos modelos de IR (miembros inferiores, riñón e intestino) respecto al daño hepático y al rol del TNF α e IL-1. Estos hallazgos podrían ser extrapolables a otros modelos, ya que es conocido que la IR renal induce un daño cardíaco mediado principalmente por el TNF α (197), mientras que la IR intestinal concurre en similitudes respecto al daño pulmonar remoto que induce (198).

La implicación de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 en las primeras fases de la respuesta inflamatoria al síndrome de IR parece clara. No obstante, recientemente se le ha atribuido un papel crucial en este proceso inicial a la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). La MCP-1 es una quimioquina que regula la migración y la activación de los monocitos y macrófagos, adquiriendo especial protagonismo en el reclutamiento de macrófagos al lugar de la inflamación y daño tisular (23). Parece ser que la MCP-1 es producida en una gran variedad de células epiteliales de forma constitutiva y tras la inducción de estrés oxidativo, citoquinas y factores de crecimiento. De hecho, la MCP-1 ha demostrado ser estimulada *in vitro* por el TNF α e IL-1 (24).

En un estudio previo usando un modelo experimental similar al actual (177), nuestro grupo demostró que la expresión pulmonar del MCP-1 aumentó al final del período de isquemia y se mantuvo elevada durante la reperfusión. En nuestro estudio previo pudimos observar que la expresión del MCP-1 siguió un patrón similar al del TNF α y la IL-1. Este dato sugiere que debe existir una intensa relación entre estos tres mediadores y confirma su fuerte implicación en la respuesta inflamatoria secundaria al síndrome de IR. Además, los resultados obtenidos coincidían con los de otros autores en los que se demostraba que la expresión de MCP-1 se relaciona con un daño pulmonar por IR en un modelo experimental en ratas (199).

De forma similar, en el actual estudio observamos que la expresión hepática del mRNA de la MCP-1 aumentó de forma significativa al final del período de isquemia y siguió aumentando durante las primeras fases de la reperfusión. La expresión hepática del MCP-1 se ha acompañado de la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1, lo cual nos hace pensar que la síntesis de estos tres mediadores está íntimamente relacionada y que actúan de forma sinérgica en el daño remoto por IR.

Paralelamente al aumento de la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 y de la quimioquina MCP-1, en el presente estudio observamos un descenso en la expresión hepática del mRNA de la IL-10. De hecho, la expresión de la IL-10 fue significativamente menor durante la reperfusión (Rp-10' y Rp-30') en comparación con su expresión en el momento Pn. La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que podría jugar un papel importante en la protección frente al daño secundario a la IR. En un modelo de IR renal (196) se observó que la IL-10 producida en el hígado aminoraba el daño isquémico renal agudo. Además, se ha comprobado que la administración exógena de IL-10 disminuye el daño renal en varios modelos experimentales (196).

El aumento de la expresión de las citoquinas proinflamatorias asociado al descenso de las citoquinas antiinflamatorias crea un desequilibrio que podría amplificar los efectos deletéreos asociados al síndrome de IR.

Por otra parte, diversos estudios experimentales usando diferentes modelos de IR han intentado determinar la implicación del metabolismo del NO en el síndrome de IR. Hay que reconocer que debido al efecto polivalente del NO, la mayoría de las conclusiones de estos estudios son contradictorias (135). No obstante, parece ser que el NO producido por las isoformas constitutivas de la enzima NOS (nNOS y eNOS) podría ser responsable de efectos beneficiosos como el control del tono vascular y de la agregación de plaquetas y neutrófilos. Por el contrario, el NO producido por la isoforma inducible de la NOS (iNOS) se ha relacionado con la fisiopatología del daño por IR, el choque y la inflamación (1, 37, 200). De hecho, la sobreproducción del NO vía iNOS durante la reperusión se ha propuesto como componente importante en la patogenia del síndrome de IR (37, 38, 200, 201).

Las tres isoformas de la NOS son expresadas en el pulmón, de hecho en nuestro estudio experimental previo comprobamos un marcado descenso de los niveles plasmáticos de NO y una menor actividad de las enzimas nNOS y eNOS en el parénquima pulmonar (135). Estos cambios se acompañaron de un incremento de la actividad de la iNOS pulmonar durante los periodos de isquemia y reperusión. Cabe recordar que el objetivo de nuestro estudio previo fue confirmar los efectos locales de la IR pulmonar (135), mientras que en el actual hemos estudiado sus efectos remotos sobre el parénquima hepático.

Lamentablemente, en el presente estudio no se han observado diferencias estadísticamente significativas en los diferentes momentos de medición de la expresión del mRNA iNOS en el parénquima hepático. Hay que reconocer que en el presente estudio no se han medido los niveles sistémicos del NO. No obstante, basándonos en averiguaciones previas (37, 38, 41, 86, 121, 200, 201) es presumible que éstos estarían elevados y que podrían

relacionarse con algunos de los efectos sistémicos del daño por IR. El halo que rodea al NO y las repercusiones de los cambios en su metabolismo en el seno del proceso de IR es un tema que todavía no está totalmente esclarecido y que precisaría de más estudios en el futuro.

El NFκB es un factor de transcripción que regula la expresión de diversos genes de relacionados con la respuesta inflamatoria. De hecho, su activación se ha relacionado con la síntesis de citoquinas proinflamatorias (TNFα e IL-1), enzimas proinflamatorias (COX-2 e iNOS), y moléculas de adhesión (159). Por todo ello, se le atribuye un papel central en las respuestas de señalización en el seno del proceso de IR. En un estudio de IR cardíaco en ratas (159), se demostró que el NFκB es activado durante los periodos de isquemia y reperfusión regulando la síntesis de los mediadores inflamatorios recientemente citados.

En nuestro estudio la expresión del mRNA del NFκB se mantuvo estable, observándose un incremento significativo aislado en el grupo CON en los primeros momentos de la reperfusión en comparación con su valor basal.

Actualmente disponemos de suficiente evidencia sobre el papel que desempeña la apoptosis o muerte celular programada en la patogenia del daño asociado al síndrome de IR (198). La apoptosis constituye un mecanismo esencial en el mantenimiento de la homeostasis y aunque interviene en diversos procesos fisiológicos, se ha relacionado también con ciertas situaciones patológicas.

De hecho, la apoptosis ha demostrado jugar un papel importante en el daño por IR hepática. En un estudio experimental de IR hepática en ratas quedó patente que la apoptosis fue la principal causa de muerte celular durante la reperfusión hepática que siguió a un tiempo prolongado de isquemia (73). La apoptosis fue el hallazgo histológico más relevante durante la fase inicial de la reperfusión, y se acompañó de una respuesta inflamatoria sistémica con afectación de órganos remotos. Parece ser que durante la etapa temprana del daño hepático por

reperfusión, la liberación de mediadores inflamatorios y los diferentes procesos de estrés resultarían en la activación de la vía de la apoptosis (73).

Paralelamente, se ha demostrado que el daño renal (isquémico y no isquémico) también induce una afectación hepática remota manifestada por un incremento de la apoptosis (191). En dicho estudio, *Golab et al* (191) observaron un aumento significativo de hepatocitos con caspasa 3 activada durante la fase inicial de daño renal. Cabe recordar que las caspasas constituyen una familia de proteasas sintetizadas como precursores enzimáticos inactivos. Dentro de esta gran familia, las caspasas 3, 8 y 9 son las que están más íntimamente relacionadas con el fenómeno de apoptosis. La activación de la Caspasa 3 en el parénquima hepático se relacionó directamente con la liberación de citoquinas proinflamatorias y con la extensión del daño hepático (191).

Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el que los niveles de caspasa 3 en el hígado aumentaron de forma significativa en el grupo CON durante todo el proceso. Dicho aumento fue más evidente durante reperfusión (Rp-10' y Rp-10') y al compararlo con el grupo SHAM.

Resultados similares son observados en un modelo experimental de IR de miembros inferiores. En dicho estudio, *McCarter et al* (194) demostraron que la actividad de la caspasa 3 se triplicó en las tres horas siguientes al inicio de la reperfusión. El aumento en la actividad de la caspasa 3 en el parénquima hepático se continuó con una fragmentación del ADN al alcanzar la sexta hora de reperfusión (194).

Parece más que evidente que la IR pulmonar, renal y de los miembros inferiores inducen una muerte celular hepática por apoptosis. Al mismo tiempo se ha comprobado que la IR orgánica también induce muerte celular pulmonar por apoptosis. Como se comenta previamente, el pulmón y el hígado han demostrado ser órganos especialmente sensibles a los efectos dañinos de la IR. La presencia de apoptosis pulmonar ha sido demostrada histológicamente en

un estudio experimental de IR intestinal. Parece ser que la apoptosis pulmonar sería inducida por diferentes vías que activarían la familia de las caspasas, proponiéndose al TNF α como una de las posibles vías de activación (198).

De forma análoga a los hallazgos observados en el hígado, la presencia de apoptosis se relacionó con la activación de la caspasa 3 en las células epiteliales pulmonares. Además, la apoptosis mostró tener una estrecha relación con las citoquinas proinflamatorias (TNF α y IL-1), proponiéndose a dichos mediadores inflamatorios como responsables de la inducción de la apoptosis pulmonar. La presencia de apoptosis pulmonar se asoció a la pérdida de la función de la barrera epitelial y endotelial pulmonar, hecho que parece precipitar el desarrollo del DPA y del SDRA (202).

Paralelamente, la IR renal también se ha asociado con apoptosis pulmonar y cardíaca (197, 203). Los resultados de estos estudios demuestran que la IR renal se asoció a una disfunción pulmonar y cardíaca, en la que la apoptosis jugó un papel fundamental. Además, la presencia de apoptosis se asoció nuevamente a una sobreexpresión de TNF α en el corazón (197), poniendo en evidencia la estrecha relación entre ambos.

Las similitudes existentes entre los estudios experimentales citados y el nuestro ponen de manifiesto la existencia de una íntima relación entre el fenómeno de apoptosis y la liberación de mediadores inflamatorios en el seno del síndrome de IR. En nuestro estudio, la IR pulmonar ha demostrado inducir la liberación de mediadores inflamatorios (TNF α , IL-1 y MCP-1) durante la fase final del periodo de isquemia y la fase inicial de la reperusión. Como quedó demostrado en un estudio previo (177) de nuestro grupo, estos mediadores desencadenan una respuesta inflamatoria local en el pulmón. Además de la respuesta inflamatoria local, en el presente estudio ha quedado patente que la IR pulmonar indujo un daño hepático remoto manifestado por la presencia de una respuesta inflamatoria y del fenómeno de apoptosis.

A tenor de los resultados obtenidos es presumible pensar que la liberación de mediadores inflamatorios en respuesta a la IR pulmonar induciría la activación de vías de señalización dando lugar a una respuesta inflamatoria hepática. En todo este complejo proceso parece ser que el TNF α juega un papel protagonista. El TNF α es el primer mediador inflamatorio en verse alterado, observándose una elevación descontrolada al final del periodo de isquemia y durante la fase inicial de reperfusión. Junto al TNF α se produce la elevación de otros mediadores inflamatorios íntimamente relacionados como son la IL-1 y el MCP-1. Ciertamente es que dichos mediadores permanecen elevados durante más tiempo durante la reperfusión, sugiriendo que su producción podría estar desencadenada por la elevación inicial de TNF α . Paralelamente, se ha sugerido que el TNF α guarda una estrecha relación con el fenómeno de apoptosis. Hemos observado, que el fenómeno de apoptosis es más evidente a los 30 minutos postreperfusión.

Este dato podría sugerir que la intensidad del fenómeno de apoptosis guardaría relación con la duración del periodo de reperfusión (73).

Por todo ello, pensamos que el TNF α es una de las moléculas más importantes en el síndrome de IR y que su elevación precoz podría relacionarse con los subsecuentes eventos. Al mismo tiempo, la elaboración de estrategias preventivas frente al proceso de IR podrían ir dirigidas a moléculas como el TNF α .

La elección del modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdos nos ha permitido comprobar los efectos del síndrome de IR pulmonar y en cierta medida dilucidar algunos de los puntos clave. Esto nos permite dar paso a la discusión de la estrategia preventiva frente al síndrome de IR presentada en nuestro trabajo.

5.2 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO PULMONAR

Debido a la magnitud de las consecuencias del síndrome de IR y a sus devastadores efectos, han sido numerosos los esfuerzos dirigidos al desarrollo de estrategias terapéuticas para prevenir o limitar su aparición. El daño asociado a la IR adquiere especial importancia en el campo de la cirugía. En su máxima expresión, el síndrome de IR puede hacer fracasar la intervención quirúrgica debido a un fallo o necrosis del injerto con efectos sistémicos adversos (204). No obstante, es importante recordar que incluso isquemias sutiles intraoperatorias pueden contribuir al desarrollo de un cuadro de inflamación sistémica que afecta directamente al curso perioperatorio e incrementa la morbilidad a largo plazo (51).

Uno de los métodos más efectivos para prevenir o atenuar las devastadoras consecuencias del síndrome de IR es el preconditionamiento isquémico. El PI se basa en la premisa de que la exposición repetida de los tejidos a breves episodios de isquemia o hipoxia podría protegerlos frente a los efectos perjudiciales de una isquemia más prolongada. Este fenómeno fue inicialmente descrito por *Murry et al* en 1986, al observar que breves periodos de IR en el corazón canino lo protegía frente a una isquemia prolongada (139). Con posterioridad, el PI ha sido estudiado en otros modelos experimentales en órganos como el corazón, el hígado y el músculo esquelético (204). No obstante, el principal foco de investigación ha sido tradicionalmente el corazón.

La evidencia pone de manifiesto la existencia de distintas fases de adaptación isquémica y protección que confiere el PI. El comienzo de la fase precoz coincide con el inicio de la reperusión, dura aproximadamente 3 horas y parece que se debe a la liberación de sustancias endógenas. Por el contrario, la fase tardía se relaciona con la síntesis de nuevas proteínas y con la alteración de la expresión génica. Los efectos de la fase tardía empiezan a hacerse evidentes a partir de las 12-24 horas del inicio de la reperusión y pueden llegar a durar semanas (180-182).

Durante años se ha especulado a cerca de los complejos mecanismos mediante los cuales el PI confiere protección frente al síndrome de IR. No obstante, siguen sin estar completamente definidos y parece ser que el PI representa un proceso multifactorial en el que participan diferentes moléculas y mediadores inflamatorios interaccionando unos con otros.

Por ejemplo, el metabolismo del NO ha demostrado tener un papel fundamental en el inicio y mantenimiento del PI. Diversos estudios centrados en el PI han demostrado que el NO modula la perfusión microvascular a través de sus efectos vasodilatadores (153) y sus efectos antiinflamatorios (154-156). En el hígado, el NO ha demostrado ser un mediador importante en el PI mediante su actuación directa sobre el endotelio (158). También se ha visto que el NO es capaz de regular la apoptosis celular mediante la inhibición de la actividad de las caspasas (142).

Recientemente se ha observado que la expresión de NFκB en respuesta a un breve episodio isquémico de los miembros inferiores induce la síntesis de iNOS, la cual también es producida en respuesta a la liberación de citoquinas (159). Se habla del efecto dual del NFκB, de modo que su producción excesiva durante el proceso de IR tendría efectos dañinos sobre el órgano, mientras que su activación durante el PI daría lugar a una respuesta adaptativa. Parece ser que el PI regularía la síntesis de NFκB mediante la estimulación de su propio inhibidor (ikB) (162). El TNFα es una citoquina que juega un papel fundamental en el síndrome de IR, por lo que se postula que el PI actuaría a dicho nivel. Diversos estudios apuntan al TNFα como una de las moléculas más importante en el PI. El PI hepático ha demostrado reducir los niveles plasmáticos de TNFα (173). Paralelamente el PI cardiaco ha demostrado reducir los efectos dañinos de la IR cardiaca en ratas manipuladas desprovistas de TNFα (160). Como se comenta en el apartado anterior, el TNFα y la IL-1 son citoquinas proinflamatorias íntimamente relacionadas entre sí. En relación a la IL-1, *Harkin et al* comprobaron que el PI de miembros inferiores bloqueó el aumento de sus niveles secundario a la IR de miembros inferiores (162, 184). Recientemente, se ha propuesto que la vía apoptótica juega un papel fundamental en el

daño asociado al síndrome de IR. En un estudio experimental de PI en el músculo esquelético se observó un aumento de la supervivencia muscular mediante la inhibición de la vía mitocondrial apoptótica (205).

Parece claro que el PI representa una herramienta eficaz en la prevención del síndrome de IR. En modelos experimentales el PI ha demostrado mejorar la función ventricular y disminuir la acumulación de neutrófilos y la apoptosis en el miocardio (206). Aunque son escasos los estudios clínicos en humanos, el PI ha mostrado reducir el riesgo postoperatorio de arritmias en pacientes sometidos a cirugía de *by-pass* aortocoronario (140) y reducir el daño hepático tras cirugía de resección hepática (207). En el caso concreto del hígado, se ha observado que el PI hepático, a través de la oclusión intermitente del flujo portal durante la cirugía de resección hepática, reduce el daño hepático por IR (195).

No obstante, la aplicación de breves episodios de IR no es la única forma de preconditionamiento orgánico. De hecho, el preconditionamiento también puede ser inducido mediante la exposición a alta temperatura o mediante la administración de agentes farmacológicos.

En un estudio experimental en ratas a las que se indujo una IR intestinal se observó una supresión de la molécula *MFG-E8* en el bazo y en el pulmón tras 4 horas de reperusión (202). La *MFG-E8* es una molécula que permite el reconocimiento de las células apoptóticas facilitando su fagocitosis y aclaramiento. La supresión de dicha molécula se acompañó por tanto de una disminución en el aclaramiento de las células apoptóticas y de una respuesta inflamatoria pulmonar. Se hallaron niveles elevados de IL-1 e IL-6 en el parénquima pulmonar que dieron lugar a una inflamación local y al desarrollo de daño pulmonar agudo. Paralelamente, la administración de *MFG-E8* redujo el número de células apoptóticas y suprimió la respuesta inflamatoria pulmonar. Por lo tanto, el *MFG-E8* constituye un claro ejemplo de preconditionamiento farmacológico en la prevención de los efectos dañinos de la IR (202).

Como se comenta previamente, el PI ha demostrado ser una estrategia eficaz en la prevención del síndrome de IR en el corazón, en el hígado, el cerebro, los riñones y el músculo esquelético (139-141, 143-145, 195). No obstante, menos son los estudios dirigidos al PI pulmonar en un intento de atenuar los efectos deletéreos de la IR pulmonar.

Nuestro grupo ha demostrado previamente que el PI pulmonar previene el aumento del estrés oxidativo, la activación de los leucocitos y la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL-1) en el parénquima pulmonar tras una IR pulmonar (177). En dicho estudio observamos que el PI previno el aumento de los metabolitos de peroxidación lipídica, la IL-1, el TNF α y el MCP-1 en un modelo experimental de IR pulmonar normotérmica en cerdos mediante la realización de un autotransplante pulmonar. El PI pulmonar mediante la aplicación de breves periodos de IR pulmonar atenuó el daño temprano asociado al síndrome de IR y el parénquima pulmonar mostró una mejor perfusión e intercambio gaseoso (177).

Paralelamente, el PI orgánico ha demostrado reducir el daño del pulmón donante durante la fase de isquemia y de reperfusión inherente al trasplante pulmonar en diversos experimentos en ratas, conejos y perros (162). El PI previno la hipertensión pulmonar, la alteración en el intercambio gaseoso y la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica.

Una vez demostrado que el PI pulmonar es una estrategia útil en la prevención del daño pulmonar por IR pulmonar, el presente estudio va más allá de nuestros pasos previos al demostrar que el PI pulmonar reduce la respuesta inflamatoria y la apoptosis en el hígado tras la IR pulmonar. En vista a estos resultados se podría especular que el PI ejerce un efecto protector local sobre el parénquima pulmonar y un efecto protector sobre órganos remotos (hepático) frente a la respuesta inflamatoria sistémica inducida por la IR pulmonar.

En 1993, *Przyklenk et al* demostraron que el PI cardiaco podía proteger un territorio a distancia distinto al lugar donde se realizó el preconditionamiento (208). Dicho fenómeno fue acuñado con el término de preconditionamiento isquémico remoto (PIR). El PIR constituye por lo

tanto una maniobra mediante la cual el PI de un órgano protege a otros órganos a distancia de los efectos dañinos del síndrome de IR.

Como se comenta previamente, el PI tiene un claro efecto protector frente al síndrome de IR, no obstante, también podría tener desventajas que limitarían su aplicación clínica (142). Algunas de estas desventajas son el estrés directo que ocasionaría sobre el órgano en cuestión y el traumatismo mecánico sobre estructuras vasculares (142).

Por todo ello, el PIR podría superar dichas limitaciones al ser llevado a cabo en vasos sanos y distantes al territorio que sufrirá los efectos de la IR prolongada. De hecho, el PIR ha sido propuesto como una novedosa maniobra terapéutica en la prevención del daño por IR.

Diversos estudios experimentales han demostrado que breves períodos de IR mesentérica, renal, intestinal o de miembros inferiores reducen la magnitud del infarto de miocardio que tiene lugar tras la IR cardíaca (142). Paralelamente, existen estudios clínicos que muestran que el PI de miembros inferiores induce una protección miocárdica (142). Los efectos del PIR también han sido observados en otros órganos como el riñón (178), el intestino (209) el músculo esquelético (167) y el hígado (174, 190).

Dos estudios experimentales en ratas han demostrado que el PI de los miembros inferiores confiere protección hepática (174, 190). En uno de ellos se comprobó que el PI de miembros inferiores redujo los marcadores bioquímicos de daño hepático y mejoró la perfusión hepática tras una isquemia hepática prolongada. Esta protección hepática se acompañó de una mejoría de los parámetros hemodinámicos y de la SaO₂ periférica, sugiriendo que el PI de miembros inferiores confirió también protección pulmonar (190). En el segundo estudio se obtuvieron resultados similares (174). El PI de miembros inferiores indujo la síntesis de la HO-1 en el parénquima hepático, la cual se relaciona directamente con el NO. De hecho, el NO ha demostrado aumentar la expresión proteica y la actividad enzimática de la HO-1 en un cultivo de hepatocitos (174). El mecanismo por el cual la HO-1 ejerce un efecto protector frente a la IR

hepática no está totalmente descifrado. No obstante, parece evidente la HO-1 confiere protección frente al síndrome de IR. De hecho, *Lai et al* (174) demostraron que el PI de miembros inferiores indujo una protección hepática frente al síndrome de IR mediada por la HO-1.

Al mismo tiempo, se ha demostrado que breves periodos de IR hepática previenen los efectos dañinos en el parénquima renal tras una IR prolongada (178). *Ates et al* (178) en un estudio experimental en ratas observaron que el PI hepático evitó el incremento de los valores de creatinina y BUN y mejoró el aclaramiento renal de creatinina. Los efectos beneficiosos del PI hepático se debieron en parte a la reducción de la peroxidación lipídica y a la disminución de las citoquinas proinflamatorias (178). Además de conferir protección renal, el PI hepático ha demostrado ejercer un efecto protector en otros órganos como el pulmón (150) o el intestino (173) en otros modelos experimentales.

Los estudios centrados en el preconditionamiento pulmonar son escasos. No obstante, *Waldow et al* (162) demostraron en un estudio experimental que la oclusión de la arteria femoral indujo un efecto protector pulmonar (162). Pese a que el PI no consiguió un bloqueo completo de la respuesta inflamatoria sistémica, fue suficiente para mantener la integridad pulmonar (162) mediante la prevención de la hipertensión pulmonar y de la disfunción pulmonar que ocurre tras la IR.

Los mecanismos que subyacen al efecto protector del PIR sobre órganos remotos y sus vías de señalización no están totalmente establecidos. El hecho de que la IR intermitente de un órgano confiera protección a otro órgano remoto podría ser explicado en parte por la liberación de mediadores o moléculas protectoras desde el órgano preconditionado. Estos alcanzarían los órganos remotos diana a través del torrente circulatorio (142). No obstante, también es posible que los procesos de IR controlado induzcan la síntesis de mediadores inflamatorios en pequeñas cantidades, los cuales activarían mecanismos protectores en los órganos diana (142).

Paralelamente, algunos autores proponen la vía neurogénica como uno de los mecanismos fundamentales en la protección ofrecida por el PIR (142). Por lo tanto, parece lógico pensar que el mecanismo de protección del PIR podría deberse a la acción sinérgica o interacción entre ambas vías de señalización, la humoral y la neurogénica.

Al mismo tiempo, el hecho de que el PI de un órgano confiera protección a otro órgano concreto situado a distancia nos obliga a pensar que debe existir un complejo mecanismo de interacción o transferencia interorgánica. La mayoría de los estudios de PIR coinciden en la transferencia de protección a órganos remotos concretos como el corazón o el hígado. Es precisamente este hecho, el que nos obliga a tener en cuenta la conexión interorgánica. Un ejemplo de esta transferencia o interacción interorgánica es el hecho de que la isquemia renal pueda estar controlada por órganos extrarrenales como el hígado. En un modelo experimental en ratas se comprobó que la isquemia renal se asoció con la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 e IL-6), pero también ejerció un efecto estimulador en la producción hepática de la citoquina antiinflamatoria IL-10. En dicho estudio se observó que el riñón isquémico respondió a los efectos de la IL-10 preservando la función renal (196). El hecho de que el hígado y otros órganos extrarrenales participen activamente en la regulación del fallo renal agudo nos lleva a la conclusión de que la afectación de dichos órganos induciría un daño renal. Este dato es sumamente importante, obligándonos a la elaboración de maniobras preventivas de preconditionamiento no sólo en el órgano que sufrirá los efectos directos de la IR prolongada, sino también en los órganos que transferirán una protección endógena.

La interacción entre el riñón y el hígado no es un dato aislado, habiéndose comprobado también una interacción entre el riñón y el pulmón (203). La traducción clínica de la transferencia interorgánica adquiere especial importancia en el campo del trasplante de órganos. Se ha demostrado que el daño traumático cerebral da lugar a una respuesta inflamatoria sistémica

(202), habiéndose observado una inflamación renal en los donantes en muerte cerebral, cosa que no ocurre en los donantes vivos (202).

En el presente estudio observamos que el PI pulmonar mediante la aplicación de dos ciclos de 5 minutos de IR atenuó la respuesta inflamatoria hepática. Los valores de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 fueron significativamente menores en el grupo PI respecto al grupo CON al final del período de isquemia y durante la reperfusión. Como se comenta previamente, el TNF α y la IL-1 resultan ser mediadores inflamatorios que actúan en la etapa temprana del daño asociado a la IR. Este podría ser el motivo por el cual el PI atenúa dichos mediadores incluso momentos antes de la reperfusión y durante los 30 minutos que dura la reperfusión en nuestro estudio. Previamente se discutía acerca de las moléculas implicadas en el síndrome de IR y consecuentemente en el PI. A tenor de nuestros resultados, puede considerarse a las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 como los mediadores inflamatorios clave en fase temprana de daño asociado al proceso de IR. Además, dichos mediadores serían responsables también de la adaptación isquémica ofrecida por el PI.

Nuestros resultados no son un hallazgo aislado, y de hecho encontramos dos estudios con resultados similares a los nuestros. En uno de ellos se muestra que el PI mediante la oclusión de ambas arterias femorales evitó el aumento de las citoquinas proinflamatorias de fase temprana TNF α e IL-1 (162). El bloqueo de dichos mediadores inflamatorios se asoció a una protección pulmonar (162). Por otra parte, *Ates et al* (178) demostraron en un estudio experimental en ratas que el PI hepático redujo los valores de TNF α , lo cual se tradujo en una protección renal frente a la isquemia prolongada (178).

La coincidencia de nuestros resultados con los de otros autores aporta credibilidad al apuntar a las citoquinas proinflamatorias de fase temprana como iniciadoras o desencadenadoras del síndrome de IR y al mismo tiempo como dianas terapéuticas para su prevención.

Tal y como se comenta en el apartado anterior, se ha demostrado recientemente que la MCP-1 juega un papel muy importante en el síndrome de IR. Además, ha quedado demostrado que la IL-1 y el TNF α regulan la expresión de MCP-1 (24). Por lo tanto, desde un punto de vista teórico el bloqueo del aumento de las citoquinas TNF α e IL-1 en el grupo preconditionado debería acompañarse de un bloqueo también de la MCP-1.

En nuestro estudio previo quedó demostrado que el PI pulmonar redujo los niveles de MCP-1 en el parénquima pulmonar tras una isquemia pulmonar prolongada (177). En el estudio actual, también observamos un bloqueo de la expresión de MCP-1 durante la reperusión. Por lo tanto, el PI pulmonar atenuó la expresión hepática de TNF α , IL-1 y MCP-1. En el caso concreto del MCP-1 se observaron diferencias significativas entre el grupo PI y CON exclusivamente durante la reperusión. Este dato nos hace pensar que la MCP-1 no actuaría en la fase temprana del preconditionamiento isquémico como es el caso de la IL-1 y TNF α , sino que sus efectos serían más tardíos.

Nuestros resultados coinciden con los de otros estudios experimentales de PI. Por ejemplo, se ha demostrado que el PI de miembros inferiores redujo los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 y de la MCP-1 en el corazón (210).

El PI pulmonar no sólo ha conseguido bloquear o atenuar la expresión hepática de las citoquinas proinflamatorias y de la MCP-1, sino que además bloqueó el descenso de los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10. El síndrome de IR pulmonar se asoció a un descenso en los niveles de IL-10 en el hígado durante la etapa de reperusión. El PI evitó este descenso, evidenciándose diferencias significativas entre el grupo PI y el grupo CON. Tal y como se comenta previamente, la IL-10 tiene efectos antiinflamatorios y ha demostrado regular el síndrome de IR a través de sus efectos beneficiosos.

Por lo tanto, el PI pulmonar evitó el aumento de las citoquinas proinflamatorias y a su vez el descenso de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en el parénquima hepático. Este hecho,

previno el desequilibrio entre citoquinas pro y antiinflamatorias que tiene lugar en el síndrome de IR.

Se ha demostrado que la vía de señalización del NFκB y sus efectos directos sobre la iNOS podría ser un mecanismo de acción del PI. En un estudio experimental en ratas (159) se observó que breves periodos de IR inducen la liberación como el NO y ERO que activan las cascadas de las quinasas (PKC). Estas sustancias activan factores de transcripción como el NFκB, que a su vez regula una batería de genes inflamatorios como la iNOS y la iCOX (159). Los resultados del citado estudio sugirieron que el PI de los miembros inferiores protegió al corazón 24 horas después de la inducción de una isquemia global. El hecho de que las ratas con depleción de NFκB no presentasen adaptación isquémica tras las maniobras de PI, apuntan a la vía de señalización NFκB y a uno de sus efectores finales (iNOS) como responsables parciales del mecanismo del PI.

Como se comenta previamente, se habla del efecto dual del NFκB, el cual ejercería un efecto dañino durante el proceso de IR sin adaptación isquémica pero con un papel clave en la adaptación a la isquemia prolongada que ofrece el PI.

Lamentablemente en nuestro estudio la expresión hepática del NFκB y de la enzima iNOS se mantuvo estable durante todo el procedimiento y no se registraron diferencias entre los grupos PI y CON. No obstante, conviene resaltar que hay importantes diferencias con nuestro estudio. Para empezar en el citado estudio se realizaron más ciclos de PI (un total de 6) en un modelo experimental en mamíferos de pequeño tamaño. Además, hubo también diferencias en el diseño experimental, pues las muestras fueron recogidas entre las 2 y las 24 horas tras la IR y el PI. Estas diferencias en el diseño experimental podrían explicar en parte las diferencias entre ambos estudios y podrían sugerir que hubiésemos encontrado también diferencias en nuestro estudio si hubiésemos tomado muestras en la fase tardía de reperusión. Por estos motivos,

pensamos que la vía de señalización del NFκB podría estar envuelta en la fase tardía del preconditionamiento.

Finalmente en nuestro estudio se observó que el PI pulmonar previno la apoptosis hepática, lo cual queda demostrado al analizar los niveles de la proteína Caspasa 3. Los niveles de Caspasa 3 en el hígado fueron significativamente inferiores en el grupo PI respecto al grupo CON durante la reperusión.

Los hallazgos de nuestro estudio respecto a la prevención de la apoptosis no son un hecho aislado. Otros autores han demostrado que la apoptosis juega un papel clave en los efectos deletéreos inducidos por la IR y a su vez el PI disminuye la actividad apoptótica. De hecho, en un estudio experimental en ratas en el que se establecieron maniobras de PI en miembros inferiores se observó una limitación de la apoptosis hepática (194).

La eficacia del PI parece depender en cierta manera del número de ciclos de IR establecidos, de la duración de cada ciclo y de la duración global de las maniobras de PI. Revisando la literatura se puede observar que diferentes regímenes de PI han demostrado ejercer un efecto protector en la prevención del síndrome de IR.

Respecto a nuestro estudio, el establecimiento de dos ciclos de 5 minutos de oclusión de la arteria pulmonar intercalando 5 minutos de reperusión entre las dos oclusiones, fue suficiente para demostrar un efecto protector hepático. Mediante el establecimiento de nuestro régimen de PI se consiguió un bloqueo de la expresión de mediadores proinflamatorios en el hígado (TNFα, IL-1, MCP-1) y se evitó la disminución de mediadores antiinflamatorios (IL-10). Además, nuestro modelo ha demostrado también que el PI pulmonar atenúa o bloquea la apoptosis hepática. Desgraciadamente no se ha podido demostrar en nuestro estudio alteraciones del NFκB ni del metabolismo del NO. Como se discute previamente este hecho puede estar relacionado con el diseño experimental de nuestro estudio, más concretamente con la duración del periodo de reperusión.

Por otra parte, una importante limitación de nuestro estudio la constituye la complejidad del procedimiento quirúrgico. Aunque ha quedado demostrado que la reperfusión pulmonar induce una clara respuesta inflamatoria y apoptosis hepática, también se encontraron incrementos de TNF α , IL-1 e MCP-1 en los animales CON antes del establecimiento de la reperfusión pulmonar. Este hecho, podría sugerir que en nuestro modelo experimental la inflamación hepática pudo ser inducida tanto por el estrés quirúrgico como por el daño remoto asociado al síndrome de IR. No obstante, el estrés quirúrgico de las grandes intervenciones y el síndrome de IR van de la mano y se solapan, por lo que no hay forma de discernir el impacto de ambos elementos por separado en la respuesta inflamatoria hepática.

A nuestro favor, tenemos que los resultados presentados en nuestro estudio tiene una relevancia obvia porque el protocolo quirúrgico usado imita procedimientos clínicos tales como el *by-pass* cardiopulmonar, la tromboembolectomía pulmonar, la resección pulmonar en manguito y el trasplante pulmonar.

Además, el hecho de que la IR pulmonar haya inducido una disfunción orgánica remota tiene una relevancia clínica y nos motiva a profundizar con futuros estudios que permitan guiar a los cirujanos torácicos en el manejo clínico de paciente con disfunción orgánica remota.

6. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio experimental la isquemia-reperfusión pulmonar indujo una respuesta inflamatoria hepática caracterizada por un desequilibrio entre las citoquinas pro y antiinflamatorias.
2. El aumento de los niveles de mediadores proinflamatorios se acompañó de un aumento en el grado de apoptosis en el parénquima hepático.
3. La respuesta inflamatoria y apoptótica hepática secundaria a la isquemia-reperfusión pulmonar fue bloqueada por el preconditionamiento isquémico pulmonar.
4. Estos resultados sugieren que el preconditionamiento isquémico pulmonar podría proporcionar protección hepática remota desde los primeros minutos de la reperfusión pulmonar, mediante la modulación de los mediadores de respuesta inflamatoria y apoptótica en el tejido hepático.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190(3):255-66.
2. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255(6):1269-75.
3. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation.* 1999;6(3):167-78.
4. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(4-5):404-33.
5. Neary P, Redmond HP. Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In *Ischemia-reperfusion Injury.* Grace PA, Mathie RT, editors: Blackwell Science: London; 1999. 123-36.
6. Davies MG, Juynh TT, Hagen PO. Endothelial physiology. In *ischemia-Reperfusion Injury.* Grace PA, Mathie RT, editors: Blackwell Science: London.; 1999. 157-79.
7. Kvietys PR, Granger DN. Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol.* 1997;273(6):1189-99.
8. Parvums DV. The pathology os ischemia-reperfusion. In *Ischemia-Reperfusion Injury.* Grace PA, Mathie RT, editors: Blackwell Science: London.; 1999. 3-19.
9. Banda MA, Lefer DJ, Granger DN. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule-deficient mice. *Am J Physiol.* 1997;273(6):2721-5.
10. Harris NR. Opposing effects of L-NAME on capillary filtration rate in the presence or absence of neutrophils. *Am J Physiol.* 1997;273(6):1320-5.
11. Ratych RE, Chuknyiska RS, Bulkley GB. The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery.* 1987;102(2):122-31.

12. Nielsen VG, Tan S, Baird MS, McCammon AT, Parks DA. Gastric intramucosal pH and multiple organ injury: impact of ischemia-reperfusion and xanthine oxidase. *Crit Care Med.* 1996;24(8):1339-44.
13. Weinbroum A, Nielsen VG, Tan S, Gelman S, Matalon S, Skinner KA, et al. Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase. *Am J Physiol.* 1995;268(6):988-96.
14. Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE. Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1992;263(3):394-401.
15. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Banerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma.* 1992;32(6):723-7.
16. Panes J, Kurose I, Rodriguez-Vaca D, Anderson DC, Miyasaka M, Tso P, et al. Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation.* 1996;93(1):161-7.
17. Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg.* 1997;84(4):513-9.
18. Barry MC, Wang JH, Kelly CJ, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Plasma factors augment neutrophil and endothelial cell activation during aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997;13(4):381-7.
19. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76(2):301-14.
20. Senger DR. Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines. *Am J Pathol.* 1996;149(1):1-7.

21. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125(2):261-72.
22. Starnes HF, Warren RS, Jeevanandam M, Gabrilove JL, Larchian W, Oettgen HF, et al. Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. *J Clin Invest.* 1988;82(4):1321-5.
23. Ajuebor MN, Gibbs L, Flower RJ, Das AM, Perretti M. Investigation of the functional role played by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in interleukin-1-induced murine peritonitis. *Br J Pharmacol.* 1998;125(2):319-26.
24. Colotta F, Borre A, Wang JM, Tattanelli M, Maddalena F, Polentarutti N, et al. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol.* 1992;148(3):760-5.
25. Baeza I, Alvarado C, Alvarez P, Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, et al. Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens. *J Reprod Immunol.* 2009;80(1-2):70-9.
26. Goto M, Katayama KI, Shirakawa F, Tanaka I. Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element. *Cytokine.* 1999;11(1):16-28.
27. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821-46.
28. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-8.
29. Al-Mehdi AB, Shuman H, Fisher AB. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol.* 1997;272(2):294-300.

30. Fisher AB, Dodia C, Tan ZT, Ayene I, Eckenhoff RG. Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J Clin Invest.* 1991;88(2):674-9.
31. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326(1):1-16.
32. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol.* 1999;36(13-14):941-8.
33. Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. Attenuation of lung graft reperfusion injury by a nitric oxide donor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;113(2):327-33.
34. Weinberger B, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD. Nitric oxide in the lung: therapeutic and cellular mechanisms of action. *Pharmacol Ther.* 1999;84(3):401-11.
35. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res.* 1994;74(3):376-82.
36. Radomski MW, Salas E. Nitric oxide--biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1995;118(S):69-80.
37. Al-Majed AA, Khattab M, Raza M, Al-Shabanah OA, Mostafa AM. Potentiation of diclofenac-induced anti-inflammatory response by aminoguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in rats: the role of nitric oxide. *Inflamm Res.* 2003;52(9):378-82.
38. Zhou JL, Jin GH, Yi YL, Zhang JL, Huang XL. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J Gastroenterol.* 2003;9(6):1318-22.
39. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12.
40. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase in the tuberculous human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(2):130-1.

41. Naidu BV, Fraga C, Salzman AL, Szabo C, Verrier ED, Mulligan MS. Critical role of reactive nitrogen species in lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant.* 2003;22(7):784-93.
42. Okabayashi K, Triantafillou AN, Yamashita M, Aoe M, DeMeester SR, Cooper JD, et al. Inhaled nitric oxide improves lung allograft function after prolonged storage. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;112(2):293-9.
43. Eppinger MJ, Ward PA, Jones ML, Bolling SF, Deeb GM. Disparate effects of nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(5):1169-75.
44. Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL, et al. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J Biol Chem.* 2002;277(17):14801-11.
45. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg.* 1998;68(8):554-61.
46. Perry MO. Compartment syndromes and reperfusion injury. *Surg Clin North Am.* 1988;68(4):853-64.
47. Velmahos GC, Toutouzas KG. Vascular trauma and compartment syndromes. *Surg Clin North Am.* 2002;82(1):125-41.
48. Ildefonso JA, Arias-Diaz J. Pathophysiology of liver ischemia-reperfusion injury. *Cir Esp.* 2010;87(4):202-9.
49. Freeman J. Liver transplantation: Anaesthesia and perioperative care. In: Blumgart LH, editor. *Surgery of the liver and biliary tract*: New York: Ed Churchill Livingstone; 1994. 1789-800.
50. Varela de Ugarte A. Primary graft failure following lung transplantation: is there hope for improvement? *Arch Bronconeumol.* 2005;41(9):473-4.
51. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg.* 2002;10(6):620-30.

52. Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg.* 2002;26(1):115-21.
53. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery.* 1989;106(2):195-201.
54. Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Ziegler TR, Wang XD. The gut: a central organ after surgical stress. *Surgery.* 1988;104(5):917-23.
55. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Bensard DD, Anderson BO, Banerjee A. Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch Surg.* 1992;127(2):175-9.
56. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol.* 1991;260(3):355-62.
57. Shiratori Y, Kiriya H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K, et al. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci.* 1994;39(6):1265-72.
58. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA, Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest.* 1990;85(6):1936-43.
59. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez F, Lopez F. Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *Circ Shock.* 1994;42(4):204-9.
60. Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol.* 1992;52(3):296-302.
61. Husztik E, Lazar G, Parducz A. Electron microscopic study of Kupffer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride. *Br J Exp Pathol.* 1980;61(6):624-30.

62. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem.* 1998;179(1-2):169-87.
63. Vardanian AJ, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Molecular mediators of liver ischemia and reperfusion injury: a brief review. *Mol Med.* 2008;14(5-6):337-45.
64. Banks JG, Foulis AK, Ledingham IM, Macsween RN. Liver function in septic shock. *J Clin Pathol.* 1982;35(11):1249-52.
65. Brienza N, Dalfino L, Cinnella G, Diele C, Bruno F, Fiore T. Jaundice in critical illness: promoting factors of a concealed reality. *Intensive Care Med.* 2006;32(2):267-74.
66. Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks TG, McCaigue MD, Leggett P, Halliday MI, et al. Lower limb ischaemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function. *Br J Surg.* 1997;84(10):1425-9.
67. Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks TG, Soong CV, Halliday MI, McCaigue MD, et al. Lower limb ischaemia-reperfusion injury causes endotoxaemia and endogenous antiendotoxin antibody consumption but not bacterial translocation. *Br J Surg.* 1998;85(6):785-9.
68. Burrows GE. Escherichia coli endotoxemia in the conscious pony. *Am J Vet Res.* 1971;32(2):243-8.
69. Horie Y, Ishii H. Liver dysfunction elicited by gut ischemia-reperfusion. *Pathophysiology.* 2001;8(1):11-20.
70. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol.* 2003;74(2):86-93.
71. Parks DA, Granger DN. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. *Hepatology.* 1988;8(3):680-2.
72. Sachs DH, Leight G, Cone J, Schwarz S, Stuart L, Rosenberg S. Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation.* 1976;22(6):559-67.

73. Arab HA, Sasani F, Rafiee MH, Fatemi A, Javaheri A. Histological and biochemical alterations in early-stage lobar ischemia-reperfusion in rat liver. *World J Gastroenterol*. 2009;15(16):1951-7.
74. Deffebach ME, Charan NB, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation. Small, but a vital attribute of the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1987;135(2):463-81.
75. Adkins WK, Taylor AE. Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *J Appl Physiol*. 1990;69(6):2012-8.
76. Mithos P, Katsaragakis S, Milingos N, Kakaris S, Sepsas E, Athanassiadi K, et al. Postresectional pulmonary oxidative stress in lung cancer patients. The role of one-lung ventilation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27(3):379-82.
77. Lausberg HF, Graeter TP, Wendler O, Demertzis S, Ukena D, Schafers HJ. Bronchial and bronchovascular sleeve resection for treatment of central lung tumors. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(2):367-71.
78. Read RC, Ziomek S, Ranval TJ, Eidt JF, Gocio JC, Schaefer RF. Pulmonary artery sleeve resection for abutting left upper lobe lesions. *Ann Thorac Surg*. 1993;55(4):850-4.
79. Bowdish ME, Barr ML. Living lobar lung transplantation. *Respir Care Clin N Am*. 2004;10(4):563-79.
80. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000;69(6):1681-5.
81. Gilroy RJ, Jr., Bhatte MJ, Wickersham NE, Pou NA, Loyd JE, Overholser KA. Postischemic hypoperfusion during unilateral lung reperfusion in vivo. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(2):276-82.
82. Miller DL, Roberts AM. Pulmonary artery occlusion and reperfusion causes microvascular constriction in the rabbit lung. *Ann Thorac Surg*. 1999;67(2):323-8.

83. Fullerton DA, Hahn AR, Koike K, Banerjee A, Harken AH. Intracellular mechanisms of pulmonary vasomotor dysfunction in acute lung injury caused by mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery*. 1993;114(2):360-6.
84. Hamvas A, Park CK, Palazzo R, Liptay M, Cooper J, Schuster DP. Modifying pulmonary ischemia-reperfusion injury by altering ventilatory strategies during ischemia. *J Appl Physiol*. 1992;73(5):2112-9.
85. Sakuma T, Takahashi K, Ohya N, Kajikawa O, Martin TR, Albertine KH, et al. Ischemia-reperfusion lung injury in rabbits: mechanisms of injury and protection. *Am J Physiol*. 1999;276(1):137-45.
86. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994;81(5):637-47.
87. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci*. 1994;307(4):284-92.
88. Fisher AB. Reactive oxygen species and cell signaling with lung ischemia. *Undersea Hyperb Med*. 2004;31(1):97-103.
89. Eckenhoff RG, Dodia C, Tan Z, Fisher AB. Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol*. 1992;72(4):1454-60.
90. Fisher AB, Dodia C. Lung as a model for evaluation of critical intracellular PO₂ and PCO. *Am J Physiol*. 1981;241(1):47-50.
91. Yang W, Block ER. Effect of hypoxia and reoxygenation on the formation and release of reactive oxygen species by porcine pulmonary artery endothelial cells. *Journal of cellular physiology*. 1995;164(2):414-23.
92. Gothard J. Lung injury after thoracic surgery and one-lung ventilation. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2006;19(1):5-10.
93. Messent M, Griffiths MJ, Evans TW. Pulmonary vascular reactivity and ischaemia-reperfusion injury in the rat. *Clin Sci*. 1993;85(1):71-5.

94. Barillari G, Albonici L, Incerpi S, Bogetto L, Pistrutto G, Volpi A, et al. Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and function. *Atherosclerosis*. 2001;154(2):377-85.
95. Koksoy C, Kuzu MA, Ergun H, Demirpence E, Zulfikaroglu B. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Ann Surg*. 2000;231(1):105-11.
96. Nishijima K, Kiryu J, Tsujikawa A, Honjo M, Nonaka A, Yamashiro K, et al. In vivo evaluation of platelet-endothelial interactions after transient retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(9):2102-9.
97. Roberts AM, Ovechkin AV, Mowbray JG, Robinson TW, Lominadze D. Effects of pulmonary ischemia-reperfusion on platelet adhesion in subpleural arterioles in rabbits. *Microvasc Res*. 2004;67(1):29-37.
98. Fetkovska N. Platelet activation by low-density lipoprotein and serotonin: effects of calcium antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19(S3):S25-8.
99. Golino P, Ambrosio G, Ragni M, Pascucci I, Triggiani M, Oriente A, et al. Short-term and long-term role of platelet activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation. *Circulation*. 1993;88(3):1205-14.
100. Lases EC, Duurkens VA, Gerritsen WB, Haas FJ. Oxidative stress after lung resection therapy: A pilot study. *Chest*. 2000;117(4):999-1003.
101. Williams EA, Quinlan GJ, Anning PB, Goldstraw P, Evans TW. Lung injury following pulmonary resection in the isolated, blood-perfused rat lung. *Eur Respir J*. 1999;14(4):745-50.
102. Demiryurek AT, Wadsworth RM. Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther*. 1999;84(3):355-65.

103. Fleming I, Michaelis UR, Breidenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res*. 2001;88(1):44-51.
104. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest*. 2002;122(6):314-20.
105. Schreck R, Baeuerle PA. Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B. *Methods Enzymol*. 1994;234:151-63.
106. Tate RM, Morris HG, Schroeder WR, Repine JE. Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J Clin Invest*. 1984;74(2):608-13.
107. White CW, Avraham KB, Shanley PF, Groner Y. Transgenic mice with expression of elevated levels of copper-zinc superoxide dismutase in the lungs are resistant to pulmonary oxygen toxicity. *J Clin Invest*. 1991;87(6):2162-8.
108. Wiklund L, McGregor CG, Miller VM. Effects of prolonged exposure to oxygen-derived free radicals in canine pulmonary arteries. *Am J Physiol*. 1996;270(6):2184-90.
109. Cherry PD, Omar HA, Farrell KA, Stuart JS, Wolin MS. Superoxide anion inhibits cGMP-associated bovine pulmonary arterial relaxation. *Am J Physiol*. 1990;259(4):1056-62.
110. Liu J, Simon LM, Phillips JR, Robin ED. Superoxide dismutase (SOD) activity in hypoxic mammalian systems. *J Appl Physiol*. 1977;42(1):107-10.
111. Marczin N, Ryan US, Catravas JD. Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263(1):170-9.
112. Eppinger MJ, Jones ML, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res*. 1995;58(6):713-8.

113. Mulligan MS, Polley MJ, Bayer RJ, Nunn MF, Paulson JC, Ward PA. Neutrophil-dependent acute lung injury. Requirement for P-selectin (GMP-140). *J Clin Invest.* 1992;90(4):1600-7.
114. Itoh Y, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Yokoyama M, Fukuuchi Y. Platelet adhesion to aortic endothelial cells in vitro after thrombin treatment: observation with video-enhanced contrast microscopy. *Thromb res.* 1998;91(1):15-21.
115. Cooper D, Chitman KD, Williams MC, Granger DN. Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(6):G1027-33.
116. Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res.* 2002;39(4):330-9.
117. Ruf A, Patscheke H. Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18. *Br J Haematol.* 1995;90(4):791-6.
118. Schurmann G. Cell adhesion. Molecular principles and initial implications for surgery. *Chirurg.* 1997;68(5):477-87.
119. Moore TM, Khimenko P, Adkins WK, Miyasaka M, Taylor AE. Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion-induced injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol.* 1995;78(6):2245-52.
120. Kubes P. Polymorphonuclear leukocyte--endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993;71(1):88-97.
121. Numata M, Suzuki S, Miyazawa N, Miyashita A, Nagashima Y, Inoue S, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol.* 1998;160(6):3031-7.

122. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1604(2):77-94.
123. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(4-5):434-56.
124. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Gozal E, Robinson TW, Roberts AM. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates platelet adhesion in subpleural arterioles caused by lung ischemia-reperfusion in rabbits. *J Appl Physiol*. 2005;99(6):2423-32.
125. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol*. 1997;37:517-54.
126. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report-2009. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28(10):1031-49.
127. Hendrix H, Schmitt J, Aeber H. Ex situ sleeve resection and autotransplantation of the left lower pulmonary lobe after extended pneumonectomy. *Chirurg*. 2000;71(7):820-3.
128. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest*. 1998;114(1):51-60.
129. Ueno T, Yokomise H, Oka T, Puskas J, Mayer E, Slutsky AS, et al. The effect of PGE1 and temperature on lung function following preservation. *Transplantation*. 1991;52(4):626-30.
130. De Oliveira NC, Osaki S, Maloney JD, Meyer KC, Kohmoto T, D'Alessandro AM, et al. Lung transplantation with donation after cardiac death donors: long-term follow-up in a single center. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(5):1306-15.
131. Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, Nakamoto K, Hsieh CM, Yamazaki F, et al. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989;98(3):333-42.

132. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia--reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;29(3):294-8.
133. Nagao RK, Cataneo AJ. Autologous lobar lung implant after pneumonectomy: experimental model in dogs. *Acta Cir Bras*. 2005;20(4):311-6.
134. Davies LG, Rosser TH, West LR. Autotransplantation of the lung in sheep. *Thorax*. 1965;20(6):481-94.
135. Simon Adiego C, Gonzalez-Casaurran G, Azcarate Perea L, Isea Vina J, Vara Ameigeiras E, Garcia Martin C, et al. Experimental Swine lung autotransplant model to study lung ischemia-reperfusion injury. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(6):283-9.
136. Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(2):210-9.
137. Eckert P, Schnackerz K. Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Ann Plast Surg*. 1991;26(1):77-84.
138. Shennib H, Kuang JQ, Giaid A. Successful retrieval and function of lungs from non-heart-beating donors. *Ann Thorac Surg*. 2001;71(2):458-61.
139. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
140. Wu ZK, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Tarkka MR. Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization. *Circulation*. 2002;106(24):3091-6.
141. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg*. 2000;232(2):155-62.

142. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *J Surg Res*. 2008;150(2):304-30.
143. Eisen A, Fisman EZ, Rubenfire M, Freimark D, McKechnie R, Tenenbaum A, et al. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis*. 2004;172(2):201-10.
144. Gasparri RI, Jannis NC, Flameng WJ, Lerut TE, Van Raemdonck DE. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16(6):639-46.
145. Ucar G, Topaloglu E, Kandilci HB, Gumusel B. Effect of ischemic preconditioning on reactive oxygen species-mediated ischemia--reperfusion injury in the isolated perfused rat lung. *Clin Biochem*. 2005;38(7):681-4.
146. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*. 2000;87(11):972-83.
147. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol*. 1995;268(5):2063-7.
148. Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol*. 1993;264(5):1327-36.
149. Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(4):1023-34.
150. Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. The anti-inflammatory potential of adenosine in ischemia-reperfusion injury: established and putative beneficial actions of a retaliatory metabolite. *Shock*. 1997;8(5):313-20.

151. Minamino T, Kitakaze M, Morioka T, Node K, Komamura K, Takeda H, et al. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. *Am J Physiol.* 1996;270(1):238-44.
152. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology.* 1999;29(1):126-32.
153. Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;139(2):213-26.
154. Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1994;267(4):562-8.
155. Harbrecht BG, Wu B, Watkins SC, Billiar TR, Peitzman AB. Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock.* 1997;8(6):415-21.
156. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1996;32(4):743-51.
157. Lochner A, Marais E, Du Toit E, Moolman J. Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;962:402-14.
158. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229(1):264-70.
159. Li G, Labruto F, Sirsjo A, Chen F, Vaage J, Valen G. Myocardial protection by remote preconditioning: the role of nuclear factor kappa-B p105 and inducible nitric oxide synthase. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;26(5):968-73.

160. Ren X, Wang Y, Jones WK. TNF-alpha is required for late ischemic preconditioning but not for remote preconditioning of trauma. *J Surg Res.* 2004;121(1):120-9.
161. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001;33(1):100-13.
162. Waldow T, Alexiou K, Witt W, Albrecht S, Wagner F, Knaut M, et al. Protection against acute porcine lung ischemia/reperfusion injury by systemic preconditioning via hind limb ischemia. *Transpl Int.* 2005;18(2):198-205.
163. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. *Cardiovasc Res.* 2002;55(3):583-9.
164. Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(5):1571-6.
165. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol.* 1997;273(4):1707-12.
166. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschitzky JA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation.* 2002;106(23):2881-3.
167. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(4):1435-43.
168. Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ. Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(10):1317-23.

169. Zhang SZ, Wang NF, Xu J, Gao Q, Lin GH, Bruce IC, et al. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology*. 2006;105(3):550-6.
170. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(1):207-16.
171. Chen YS, Chien CT, Ma MC, Tseng YZ, Lin FY, Wang SS, et al. Protection "outside the box" (skeletal remote preconditioning) in rat model is triggered by free radical pathway. *J Surg Res*. 2005;126(1):92-101.
172. Moses MA, Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Huang N, Zair M, et al. Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(2):559-67.
173. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Pajdo R, Kwiecien S, Pawlik M, et al. Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves. *Eur J Pharmacol*. 2004;499(1-2):201-13.
174. Lai IR, Chang KJ, Chen CF, Tsai HW. Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: the protective role of heme oxygenase-1. *Transplantation*. 2006;81(9):1311-7.
175. Lai IR, Ma MC, Chen CF, Chang KJ. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. *Transplantation*. 2004;77(7):1004-8.
176. Kuntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobiling R, Gebhard MM, Germann G. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery*. 2002;22(6):221-6.
177. Simon C, Vara E, Garutti I, Gonzalez-Casaurran G, Azcarate L, Isea J, et al. Modulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by ischaemic preconditioning in a lung autotransplant model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012;41(4):933-9.

178. Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*. 2002;74(9):1247-51.
179. Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, Kwiecien S, Sliwowski Z, Drozdowicz D, et al. Importance of brain-gut axis in the gastroprotection induced by gastric and remote preconditioning. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(1):165-77.
180. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*. 1998;275(5):1542-7.
181. Singh D, Chopra K. Evidence of the role of angiotensin AT(1) receptors in remote renal preconditioning of myocardium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2004;26(2):117-22.
182. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(2):556-64.
183. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*. 1997;96(5):1641-6.
184. Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia--reperfusion protects against acute lung injury. *J Vasc Surg*. 2002;35(6):1264-73.
185. Xia Z, Herijgers P, Nishida T, Ozaki S, Wouters P, Flameng W. Remote preconditioning lessens the deterioration of pulmonary function after repeated coronary artery occlusion and reperfusion in sheep. *Can J Anaesth*. 2003;50(5):481-8.
186. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children

undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(11):2277-82.

187. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

188. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.

189. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

190. Kanoria S, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 2006;93(6):762-8.

191. Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney Int.* 2009;75(8):783-92.

192. Mithos P, Katsaragakis S, Theodorou D, Milingos N, Skottis I. The degree of oxidative stress is associated with major adverse effects after lung resection: a prospective study. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;29(4):591-5.

193. Henrion J, Deltenre P, De Maeght S, Peny MO, Schapira M. Acute lower limb ischemia as a triggering condition in hypoxic hepatitis: a study of five cases. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45(3):274-7.

194. McCarter SD, Akyea TG, Lu X, Bihari A, Scott JR, Badhwar A, et al. Endogenous heme oxygenase induction is a critical mechanism attenuating apoptosis and restoring microvascular perfusion following limb ischemia/reperfusion. *Surgery.* 2004;136(1):67-75.

195. Brock RW, Lawlor DK, Harris KA, Potter RF. Initiation of remote hepatic injury in the rat: interactions between Kupffer cells, tumor necrosis factor-alpha, and microvascular perfusion. *Hepatology*. 1999;30(1):137-42.
196. Kielar ML, Rohan Jeyarajah D, Lu CY. The regulation of ischemic acute renal failure by extrarenal organs. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(4):451-7.
197. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(6):1549-58.
198. Collange O, Fabienne T, Nathalie R, Christian T, Vincent R, Bertrand D, et al. Pulmonary apoptosis after supraceliac aorta clamping in a rat model. *J Surg Res*. 2005;129(2):190-5.
199. Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(5):1018-26.
200. McDonald M, Abdelrahman M, Cuzzocrea S, Thiernemann C. Tyrphostin reduces the organ injury in haemorrhagic shock: role of inducible nitric oxide synthase. *Resuscitation*. 2003;58(3):349-61.
201. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*. 2000;28(4):37-52.
202. Cui T, Miksa M, Wu R, Komura H, Zhou M, Dong W, et al. Milk fat globule epidermal growth factor 8 attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(3):238-46.
203. White LE, Hassoun HT. Inflammatory Mechanisms of Organ Crosstalk during Ischemic Acute Kidney Injury. *Int J Nephrol*. 2012;2012:505197.
204. Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tatlidede HS, Randolph MA, Austen WG, Jr. Ischemic preconditioning of skeletal muscle mitigates remote injury and mortality. *J Surg Res*. 2008;148(1):24-30.

205. Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, Pottecher J, et al. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg.* 2012;55(2):497-505.
206. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation.* 2001;104(24):2981-9.
207. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004;70:71-86.
208. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation.* 1993;87(3):893-9.
209. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation.* 1996;94(9):2193-200.
210. Wei M, Xin P, Li S, Tao J, Li Y, Li J, et al. Repeated remote ischemic postconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction. *Circ Res.* 2011;108(10):1220-5.

8. ANEXOS